



User's Manual

Testosterone ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Free Testosterone in human serum and plasma

IVD



REF

DEM-DE2924



96 wells

***Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.***

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	DESTINAZIONE D'USO	10
2	PRINCIPIO DEL METODO.....	10
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	11
4	AVVERTENZE.....	11
5	PRECAUZIONI	12
6	PROCEDIMENTO	12
7	CONTROLLO QUALITA'	13
8	RISULTATI	14
9	VALORI DI RIFERIMENTO	14
10	PARAMETRI CARATTERISTICI	15
11	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO.....	16
12	BIBLIOGRAFIA.....	16
13	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	16
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	24

1 DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Testosterone Libero nel siero o plasma umano.

Il kit Free Testosterone è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 Significato Clinico

Il testosterone è un ormone steroideo del gruppo degli androgeni. Il testosterone è secreto dai testicoli nei maschi e dalle ovaie nelle femmine anche se piccole quantità sono secrete dalle ghiandole adrenali. È il principale ormone sessuale maschile e uno steroide anabolico. Svolge ruoli chiave nella salute e nel benessere di uomini e donne.

Soltanto una piccola parte (< 1%) del testosterone circolante esiste come testosterone non legato o libero. Circa il 60%, è legato alle SHBG con alta affinità, mentre il resto è legato all'albumina. Entrambe le frazioni albumina-legato e libero possono essere biologicamente attive, mentre il legame alle SHBG inibisce l'azione del testosterone. Gli effetti del testosterone possono essere classificati come effetti virilizzanti ed anabolici. Gli effetti anabolici includono lo sviluppo della massa muscolare e la resistenza, aumento della densità e della resistenza ossea e stimolazione dello sviluppo lineare dell'osso. Gli effetti di virilizzanti includono la maturazione degli organi sessuali.

I livelli del testosterone declinano gradualmente con l'età negli uomini.

La misura della frazione libera o non legata del testosterone del siero è un metodo per valutare l'ormone fisiologicamente bioattivo. I livelli di testosterone libero sono elevati in donne con l'iperandrogenismo connesso con l'irsutismo in presenza o assenza di ovaie policistiche. In più, la misurazione del testosterone libero è più utile della misurazione di testosterone totale in situazioni in cui l'SHBG è aumentato o diminuito (per esempio ipotiroidismo e obesità).

2 PRINCIPIO DEL METODO

Nel sangue il Testosterone è legato alle SHBG (60%) ed in minore quantità ad altre proteine (ad esempio albumina). Solo la misura del Testosterone libero (<1% del Testosterone totale) permette la stima dell'ormone biologicamente attivo.

Il Testosterone libero (antigene) presente nel campione compete con il Testosterone antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) presente nel Coniugato nei confronti dell'anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra (fase solida). Il Testosterone legato a proteine non partecipa a questa competizione e viene lavato via durante la fase di lavaggio (per la misura del Testosterone totale è disponibile il kit ELISA "Testosterone").

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution.

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del Testosterone libero presente nel campione.

La concentrazione di Testosterone libero nel campione è calcolata sulla base di una curva standard.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Free Testosterone **Standard (Standard 0 – 5)** (6 flaconi, 1 mL ciascuno)
2. Free Testosterone **Control** (1 flacone, 1 mL)
La concentrazione del Controllo è lotto-specifica ed è indicata sul Foglio di Controllo
3. **Enzyme Conjugate** (1 flacone, 15 mL)
Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)
4. **Microtiterwells** (1 micropiastra breakable)
Anti-Testosterone IgG adsorbito su micropiastra
5. **TMB Substrate Solution** (1 flacone, 15mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
6. **Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido soluzione 0,3 N (evitare il contatto con la pelle)
7. **Wash Solution** 10X Conc. (1 flacone, 50 mL)
NaCl 160 g/L; Tween-20 10 g/L, 0.2M Phosphate buffer, pH 7,4

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare. Una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4 AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non usare internamente nè esternamente su esseri umani o animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido soluzione diluito. L'acido soluzione è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Testosterone libero da 0,06 pg/mL a 100,0 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Testosterone.

5 PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2 °C - 8 °C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso.
- Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva standard in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 PROCEDIMENTO

6.1 Preparazione degli Standards (S₀ - S₅)

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per 5 minuti.

Gli Standards sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Testosterone:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

Stabili 6 mesi a 2 °C - 8 °C dall'apertura dei flaconcini

6.2 Preparazione del campione

La determinazione del Testosterone si effettua su siero o plasma umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20 °C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.3 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL.

Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2 °C - 8 °C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione, diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4 Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).

Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.

Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.

Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva standard (S_0 - S_5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione/ Controllo	Bianco
Standard S_0 - S_5	20 μ L		
Campione/Controllo		20 μ L	
Enzyme Conjugate	100 μ L	100 μ L	
Incubare 1 h a +37 °C. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 μ L di wash solution diluita.			
TMB Substrate Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente 22 °C – 28 °C, al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco.			

7 CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Testosterone libero per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend.

Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva standard per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8 RISULTATI

8.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva standard (C_0 - C_5) e di ogni campione.

8.2 Curva standard

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascuno Standard (S_0 - S_5) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti standard (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

Interpolare i risultati sul grafico, leggendo i valori di concentrazione in pg/mL corrispondenti alle assorbanze di ciascun campione sulla curva disegnata.

9 VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni sieriche di Testosterone libero sono comprese nei seguenti intervalli:

	Mediana	Media \pm 1SD pg/mL	Range pg/mL
Uomini	14	13,0 \pm 7,0	4,5 - 42
Donne			
Ovulazione	1,3	1,4 \pm 0,9	ND - 4,1
Contraccettivi orali	0,9	1,1 \pm 0,6	0,3 - 2,0
Post-menopausa	0,8	0,9 \pm 0,5	0,1 - 1,7

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame.

Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10 PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Precisione

Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (15x) la misura di tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è $\leq 10\%$.

Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la concentrazione di cinque differenti sieri di controllo e due campioni sierici. La variabilità inter-assay è $\leq 10\%$.

10.2 Sensibilità

La sensibilità è stata calcolata sulla base di 20 replicati dello Standard 0 e almeno due replicati dello Standard 1, e successiva analisi per regressione lineare. La concentrazione minima di Testosterone libero misurabile che può essere distinta dallo Standard 0 è 0,06 pg/mL.

10.3 Specificità

Sono stati dosati i potenziali antigeni cross reagenti e alcune sostanze interferenti (anticoagulanti)

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Analita	% Cross reattività
Testosterone	100
DHT	0,00008
Androstenedione	0,0043
Androsterone	0,00029
DHEA-S	0,00007
Cortisolo	< 0,00001
Cortisone	< 0,00001
17 β Estradiolo	0,00005
Estrone	< 0,00001
Prednisone	< 0,00001
17 α Etinilestradiolo	< 0,00001
Norgestrel	0,00001
Danazolo	< 0,00001
Aldosterone	< 0,00001
Sodio Citrato	< 0,00001
EDTA	< 0,00001
Eparina	< 0,00001

10.4 Correlazione con RIA

Il kit Free Testosterone è stato comparato con il kit Free Testosterone RIA (DPC-Coat a Count) disponibile in commercio. Sono stati testati 24 campioni sierici femminili e 17 maschili.

La curva di regressione è:

$$DE2924 = 0,957 * (\text{Free Testo RIA}) + 0,953$$

$$r^2 = 0,937$$

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

12 BIBLIOGRAFIA

1. McCann D, Kirkish L. J. Clin. Immunoassay 1985;8:234-6
2. EkinsRP. , J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163 – 80
3. Paulson JD, et al., Am. J Obst. Gynecol 1977;128:851-7
4. Odland V. et al., Clin. Endocrinology 1982;16:243-49
5. Green PJ., Clin Chem 1982;28:1237
6. Wu CH., Obstet Gynecol. 1982;60:188-94

13 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV % intra-saggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV % inter-saggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Li StarFish distribuisce: