



Testosterone Libero Test System Codice Prodotto: 5325-300

1.0 INTRODUZIONE

Uso previsto: Determinazione quantitativa della concentrazione di Testosterone Libero in siero o plasma umano con metodo immunoenzimatico.

2.0 DESCRIZIONE DEL TEST

Il testosterone (17 β -Hydroxy-4-androstene-3-one) è uno steroide C-19 del gruppo androgeno.¹ In maschi sani in età prepuberale il testosterone viene prodotto principalmente dai testicoli e solo una piccola quantità deriva dalla conversione periferica del 4-Androstene-3, 17-dione (ASD).² È stato stimato che nelle donne adulte oltre il 50% di testosterone presente deriva dalla conversione periferica dell'androstenedione (ASD) secreto dalla corteccia surrenale e dalle ovaie.

Negli uomini il testosterone è sintetizzato principalmente dalle cellule interstiziali di Leydig e dai testicoli ed è regolato dall'ormone stimolante le cellule interstiziali (ICSH) o dall'ormone luteinizzante (LH) proveniente dall'ipofisi anteriore (l'equivalente femminile dell'ICSH).³

Il testosterone è responsabile dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari, quali gli organi sessuali accessori (prostata, vescicole seminali) e della crescita dei peli e della barba. La determinazione dei livelli di testosterone è utile per la valutazione dell'ipogonadismo. Alti livelli di testosterone negli uomini possono essere rilevati nella sindrome da insensibilità agli androgeni (femminizzazione testicolare). Cause comuni di bassi valori di testosterone negli uomini includono: ipogonadismo, orchietomia, terapia con estrogeni, sindrome di Klinefelter, ipopituitarismo e cirrosi epatica.^{2,4}

Nelle donne i livelli di testosterone sono generalmente più bassi rispetto a quelli negli uomini sani. Il testosterone nelle donne proviene da tre fonti. È secreto in piccole quantità dalle ghiandole surrenali e dalle ovaie e, in donne sane, il 50-60% della produzione giornaliera di testosterone è causata dal metabolismo periferico del pro-ormone (principalmente l'androstenedione). Le cause più comuni di aumento dei livelli sierici di testosterone nelle donne includono ovaio policistico (sindrome di Stein-Leventhal), tumori ovarici, tumori surrenalici e iperplasia surrenalica. La virilizzazione nelle donne è associata alla somministrazione di androgeni e alla sovrapproduzione endogena di testosterone. Sembra esserci una correlazione tra i livelli sierici di testosterone e il grado di virilizzazione nelle donne, anche se circa il 25% delle donne con vari gradi di virilismo hanno livelli sierici di testosterone che rientrano nel range di riferimento femminile.

La maggior parte del testosterone circola nel sangue legato alle proteine di trasporto: è debolmente legato alla proteina legante l'albmina e il cortisolo (25-65% delle donne; 45-85% degli uomini) e strettamente legato alla globulina legante l'ormone sessuale (SHBG) (35-75% delle donne; 14-50% degli uomini).⁵ Solo una piccola frazione di testosterone rimane non legata o libera e questa forma è

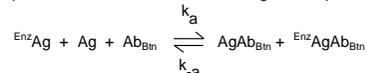
biologicamente attiva. Pertanto la concentrazione dell'ormone libero è un buon indicatore dell'attività biologica del testosterone totale.

3.0 PRINCIPIO

Dosaggio immunoenzimatico competitivo (TYPE 7):

I reagenti richiesti per un saggio immunoenzimatico includono anticorpo, antigene coniugato all'enzima e antigene nativo.

Una volta miscelati l'anticorpo biotinilato, l'antigene coniugato all'enzima e il siero contenente l'antigene nativo libero, avviene una reazione di competizione tra l'antigene nativo libero e l'antigene coniugato all'enzima per un numero limitato di siti leganti l'anticorpo. L'interazione è illustrata nella seguente equazione:



Ab_{Bt} = Biotinylated Antibody (Constant Quantity)

Ag = Native Antigen (Variable Quantity)

EnzAg = Enzyme-antigen Conjugate (Constant Quantity)

AgAb_{Bt} = Antigen-Antibody Complex

$\text{EnzAg Ab}_{\text{Bt}}$ = Enzyme-antigen Conjugate -Antibody Complex

k_a = Rate Constant of Association

k_a = Rate Constant of Disassociation

$K = k_a / k_a$ = Equilibrium Constant

Contemporaneamente avviene una reazione tra la biotina legata all'anticorpo e la streptavidina immobilizzata sul pozzetto. La separazione della frazione legata dall'anticorpo avviene dopo decantazione o aspirazione.

$\text{AgAb}_{\text{Bt}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Bt}} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \rightarrow \text{immobilized complex}$
 $\text{Streptavidin}_{\text{CW}} = \text{Streptavidin immobilized on well}$
Immobilized complex = sandwich complex bound to the solid surface

L'attività enzimatica nella frazione legata dall'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo. Attraverso diversi sierici di riferimento di concentrazione nota di antigene è possibile generare una curva di calibrazione standard da cui è possibile determinare l'attività dell'antigene del campione in esame.

4.0 REAGENTI

Materiale fornito:

A. Calibratori Testosterone Libero* – 1ml/fiala - Icone A-G

Sette (7) fialoni di calibratori per Testosterone Libero a concentrazione **approssimativa** di 0 (A), 0.2 (B), 1.0 (C), 2.1 (D), 5.6 (E), 13.8 (F) and 37.5 (G) in pg/ml. Conservare a 2-8°C. Contengono conservanti. I calibratori possono essere misurati in concentrazione molare (pM/L) moltiplicando per 3.47. Per esempio: 1pg/ml x 3.47 = 3.47 pM/L

* L'esatta concentrazione è indicata sulle etichette e può variare in funzione del lotto.

B. Reagente Enzimatico Testosterone Libero – 6ml/fiala

Un (1) fialone di Coniugato perossidasi di rafano (HRP) Testosterone coniugato in una matrice proteica stabilizzante con colorante giallo. Conservare a 2-8°C.

C. Testosterone Libero Reagente Biotina – 6ml/fiala - Icona

Un (1) fialone di reagente contenente IgG di coniglio biotinilato purificate anti-Testosterone in soluzione tampone con colorante blu e conservante. Conservare a 2-8°C.

D. Micropiastre coattata con Streptavidina – 96 pozzetti – Icona

Una micropiastre da 96 pozzetti coattata con 1.0 $\mu\text{g/ml}$ di streptavidina confezionata in un foglio di alluminio con agenti essiccanti. Conservare 2-8°C.

E. Soluzione di lavaggio concentrata – 20ml - Icona

Un (1) fialone contenente surnatante in soluzione salina. Contiene conservanti. Conservare a 2-8°C.

F. Substrato A – 7ml/fiala - Icona

Un (1) fialone contenente tetramethylbenzidine (TMB) in buffer acetato. Conservare a 2-8°C. Vedere la sezione "Preparazione dei Reagenti"

G. Substrato B – 7ml/fiala - Icona

Un (1) fialone contenente perossido di idrogeno (H_2O_2) in buffer acetato. Vedere la sezione "Preparazione dei Reagenti"

H. Soluzione Stop - 8ml/fiala - Icona

Un (1) fialone contenente (1N HCl). Conservare a 2-8°C.

I. Istruzioni per l'uso

Nota 1: Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

Nota 2: Evitare l'esposizione prolungata alla luce e al calore. **I reagenti aperti sono stabili 60 giorni se conservati a 2-8°C. La stabilità del kit e dei componenti è identificata in etichetta.**

Nota 3: I reagenti sopra descritti sono per una piastra da 96 pozzetti.

4.1 Materiale richiesto ma non fornito:

- Pipetta in grado di erogare volumi di 20 μl , 50 μl e 100 μl con una precisione maggiore di 1.5%.
- Dispensatore per erogazioni ripetitive di 0.100 & 0.350ml (100 & 350 μl) volumi con una precisione maggiore di 1.5%.
- Dispensatore a volume variabile (200-1000 μl) per il coniugato.
- Lavatore per micropiastre o bottiglia a spruzzetta (opzionale).
- Lettore per micropiastre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 nm).
- Carta assorbente per asciugare i pozzetti della micropiastre.
- Involucro di plastica o coperchio per micropiastre per i passaggi in incubazione.
- Aspiratore (optional) per le fasi di lavaggio.
- Timer.
- Controlli di qualità interni.

5.0 PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro
Non per uso interno o esterno su soggetti umani o animali

Gli standard presenti nel kit sono stati testati e sono risultati non reattivi per la presenza di HBsAg, HCV, HIV e altri agenti infettivi. Poiché nessun metodo attualmente disponibile può offrire assicurazione completa che questi agenti siano assenti, tutti gli standard devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati con le normali precauzioni.

Smettere i componenti del kit in base alle regolamentazioni locali o statali.

6.0 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni possono essere siero, plasma o sangue. Osservare le normali precauzioni nella raccolta dei campioni. Per un confronto accurato attraverso cui stabilire valori normali, prelevare il campione di mattina a digiuno. Raccogliere il campione per via venosa, in una provetta senza additivi o anti-coagulanti (siero) o provette sottovuoto contenenti EDTA o eparina (plasma). Lasciare che il sangue coaguli (siero). Centrifugare il campione per separare il siero o il plasma dalle cellule.

I campioni possono essere conservati a 2-8°C al massimo per cinque (5) giorni. Se il campione non è testato entro questo lasso di tempo, può essere conservato a -20°C fino a 30 giorni. Evitare l'uso di apparecchiature contaminate. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testato in doppio, è richiesto 0.050ml (50 μl) di campione.

7.0 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli bassi, normali e alti per monitorare le prestazioni del test. Questi controlli devono essere trattati come ignoti ed i valori devono essere determinati in ogni test effettuato. Creare delle tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per verificare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazione del test. Inoltre, la capacità di assorbanza massima dovrebbe essere coerente con l'esperienza passata. Una deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare un cambiamento inavvertito nelle condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti del kit. Utilizzare reagenti nuovi per determinare il motivo delle variazioni.

8.0 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Soluzione di lavaggio

Diluire la soluzione di lavaggio concentrata a 1000 ml con acqua distillata o deionizzata. Conservare a 2-30°C fino ad un massimo di 60 giorni.

2. Soluzione Substrato - Stabile per un anno.

Versare il contenuto del fialone ambrato etichettato "Soluzione A" nel fialone trasparente etichettato "Soluzione B". Mettere il tappo giallo sul fialone trasparente per un'immediata identificazione. Miscelare ed etichettare di conseguenza. Conservare a 2 - 8°C.

Nota 1: Non utilizzare la soluzione substrato se assume una colorazione blu.

Nota 2: Non utilizzare reagenti contaminati o che presentano sviluppo batterico.

9.0 PROCEDURA DEL TEST

Prima di iniziare il test portare tutti i reagenti, i controlli e i calibratori a temperatura ambiente (20-27°C).

****Il test deve essere eseguito da personale qualificato****

- Utilizzare un pozzetto della micropiastre per ciascun calibratore, controllo e campione del paziente da essere testato in duplicato. **Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto di alluminio, chiudere ermeticamente e conservare a 2-8°C.**
- Pipettare 0.020ml (20 μl) di campione, controllo o standard nell'apposito pozzetto.
- Aggiungere 0.050ml (50 μl) di Reagente Enzimatico Testosterone Libero in ciascun pozzetto.
- Agitare delicatamente la micropiastre per 20-30 secondi.
- Aggiungere 0.050 ml (50 μl) Testosterone Libero Reagente Biotina in ciascun pozzetto.
- Agitare delicatamente la micropiastre per 20-30 secondi.
- Coprire e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente.
- Eliminare il contenuto della micropiastre per decantazione o aspirazione. Se per decantazione, asciugare la piastra con carta assorbente.
- Aggiungere 0.350ml (350 μl) di soluzione di lavaggio (vedere la sezione "Preparazione dei Reagenti") far decantare (picchiettare e asciugare) o aspirare. Ripetere per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. **Può essere utilizzato un lavatore manuale o automatico. Seguire le istruzioni del produttore per un uso corretto.**
- Aggiungere 0.100ml (100 μl) di soluzione di lavoro substrato in ogni pozzetto (vedere la sezione "Preparazione dei Reagenti"). **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso ordine per minimizzare le differenze di tempi di reazione tra i pozzetti. NON AGITARE LA PIASTRA DOPO L'AGGIUNTA DEL SUBSTRATO**
- Incubare a temperatura ambiente per quindici (15) minuti.
- Aggiungere 0.050ml (50 μl) di soluzione Stop in ogni pozzetto e agitare delicatamente per 15-20 secondi. **Aggiungere i reagenti nello stesso ordine per minimizzare le differenze di tempi di reazione tra i pozzetti.**
- Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (usando un filtro di riferimento a 620-630nm per minimizzare le imperfezioni tra i pozzetti) con un lettore di micropiastre. **Leggere i risultati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione stop.**

10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

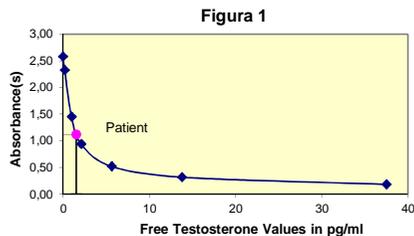
Utilizzare una curva standard per determinare la concentrazione di Testosterone Libero in campioni non noti.

- Registrare le assorbanze ottenute come indicato nell'esempio 1.
- Riportare l'assorbanza di ogni standard in duplicato in funzione della rispettiva concentrazione di Testosterone Libero su carta semilogaritmica in pg/ml.
- Tracciare la migliore curva di calibrazione.
- Per determinare la concentrazione di Testosterone Libero tracciare l'assorbanza media di ciascun campione sull'asse verticale, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in pg/ml) dall'asse orizzontale. Nell'esempio riportato, l'assorbanza media 1.367 interseca la curva standard di concentrazione di Testosterone Libero a (1.67pg/ml) (vedi Figura 1).

Nota: Per l'elaborazione della curva possono essere utilizzati dei software progettati appositamente per i dosaggi ELISA su micropiastre. **Se tali software venissero utilizzati, è bene accertarsi che siano validati.**

ESEMPIO 1				
Sample ID.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value (pg/ml)
Cal A	A1	2.605	2.578	0
	B1	2.561		
Cal B	C1	2.387	2.320	0.20
	D1	2.252		
Cal C	E1	1.447	1.446	1.00
	F1	1.444		
Cal D	G1	0.948	0.934	2.13
	H1	0.920		
Cal E	A2	0.530	0.517	5.64
	B2	0.504		
Cal F	C2	0.328	0.316	13.80
	D2	0.304		
Cal G	G2	0.184	0.182	37.50
	H2	0.180		
Patient	A3	1.071	1.113	1.56
	B3	1.154		

* I dati riportati nell'esempio 1 e nella figura 1 sono esemplificativi del dosaggio e non devono essere utilizzati per calcolare i risultati analitici nei dosaggi dei campioni.



11.0 PARAMETRI Q.C.

Affinché i risultati del test risultino attendibili devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- L'assorbanza (OD) del calibratore 0 pg/ml deve essere ≥ 1.3 .
- Quattro su sei pool di controllo qualità devono rientrare entro i limiti stabiliti.

12.0 PRECAUZIONI

La scheda di sicurezza di questo prodotto è disponibile su richiesta.

12.1 Performance

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia lo stesso per ottenere risultati riproducibili.
- L'aggiunta del campione non deve avvenire oltre i dieci (10) minuti per evitare risultati scorretti.
- Non utilizzare campioni altamente lipemici, emolizzati o contaminati.
- Se si utilizza più di una piastra, è raccomandabile generare un'altra curva di riferimento standard.
- L'aggiunta della soluzione substrato dà inizio ad una reazione cinetica che termina con l'aggiunta della soluzione stop.

Pertanto il substrato e la soluzione stop devono essere aggiunti nella stessa sequenza per evitare scarti temporali durante la reazione.

- I lettori di micropiastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- La mancata rimozione della soluzione in fase di lavaggio per aspirazione o decantazione può determinare risultati errati.
- Usare componenti dello stesso lotto. Non interscambiare reagenti di lotti differenti.
- Pipettare in maniera accurata e precisa e il rispetto di tempi e temperature richiesti sono essenziali.
- Tutte le norme nazionali applicabili, regolamenti e leggi, tra cui, ma non limitato a, buone procedure di laboratorio, devono essere seguite scrupolosamente per garantire l'utilizzo corretto del dispositivo.
- È importante calibrare le attrezzature, pipette, lettori, lavatoi e/o strumenti automatici utilizzati con questo dispositivo ed eseguire la manutenzione di routine.
- MSDS – come previsto dalla Direttiva 98/79/EC – per questo e altri dispositivi possono essere richiesti via mail Monobind@monobind.com.

12.2 Interpretazione

1. **L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da personale qualificato.**

- I risultati di laboratorio sono solo un aspetto per determinare la cura del paziente e non devono essere l'unica base per la terapia, in particolare se in conflitto con altri determinanti.
- I reagenti sono stati formulati per eliminare al massimo le interferenze. Tuttavia una potenziale interazione tra rari campioni di siero e i reagenti può causare risultati errati. Gli anticorpi eterofili sono spesso causa di queste interazioni ed è nota la loro problematicità con tutti i tipi di saggi immunologici. (Boscato LM Stuart MC. 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays' *Clin.Chem.* 1988:3427-33). A scopo diagnostico, i risultati di questo saggio devono essere utilizzati in combinazione con altre indagini cliniche e la storia clinica del paziente.
- Per risultati validi, controlli adeguati e altri parametri devono essere compresi nei range elencati e nei requisiti del test.
- Se il kit è alterato miscelando reagenti di kit diversi e produce risultati errati, o se i risultati vengono interpretati in maniera non corretta, Monobind non avrà alcuna responsabilità.
- Se si utilizza un software per dosaggi Elisa, i valori dei calibratori devono cadere entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

13.0 VALORI ATTESI

In accordo con intervalli² di riferimento stabiliti per una popolazione sana, i range attesi per il test system Testosterone Libero AccuBind® ELISA sono specificati nella Tabella 1.

TABELLA 1	
Valori attesi per il test Testosterone Libero (pg/ml)	
Maschi	4.0 – 30.0
Femmine	0.4 – 7.1

È importante ricordare che la creazione di un range di valori attesi attraverso un determinato metodo per una popolazione "sana" dipende da una molteplicità di fattori: la specificità del metodo, la popolazione testata e la precisione del metodo. Per queste ragioni ogni laboratorio deve dipendere da un range di valori attesi stabiliti dal produttore solo fino a quando non verrà determinato un range utilizzando una popolazione indigena nell'area in cui è situato il laboratorio.

14.0 CARATTERISTICHE

14.1 Precisione

La precisione del test system Testosterone Libero AccuBind® ELISA è stata determinata analizzando tre diversi pool di sieri di controllo. Il numero (N), i valori medi (X), la deviazione standard (σ) e il coefficiente di variazione (C.V.) per ognuno di questi sieri di controllo sono illustrati nella Tabella 2 e 3.

TABELLA 2				
Variazione intra-dosaggio (Valori in pg/ml)				
Sample	N	X	σ	C.V.%
Low	20	3.64	0.16	4.4%
Normal	20	26.68	1.27	4.8%
High	20	39.83	0.71	1.8%

TABELLA 3				
Variazione inter-dosaggio (Valori in pg/ml)				
Sample	N	X	σ	C.V.%
Low	20	3.45	0.34	9.9%
Normal	20	22.49	2.10	9.3%
High	20	36.60	2.92	8.0%

* Misurati su 10 saggi in duplicato in un arco di tempo di 10 giorni.

14.2 Sensibilità

Il test system Testosterone Libero AccuBind® ELISA ha una sensibilità di 0.0019 pg/well. Questo equivale ad un campione con una concentrazione di 0.095pg/ml. La sensibilità è stata calcolata determinando la variabilità del calibratore 0 ng/ml e utilizzando un 2σ (95% certezza).

14.3 Specificità

La cross reattività degli anticorpi del Testosterone Libero a determinate sostanze è stata valutata aggiungendo le sostanze interferenti in varie concentrazioni ad una matrice di siero.

Sostanza	Cross Reattività
Testosterone	1.0000
Androstenedione	0.0009
Dihydrotestosterone	0.0178
Cortisone	<0.0001
Corticosterone	<0.0001
Cortisol	<0.0001
Spirolactone	<0.0001
Progesterone	<0.0001
17 α -OH Progesterone	<0.0001
DHEA sulfate	<0.0001
Estradiol	<0.0001
Estrone	<0.0001
Estriol	<0.0001
Hemolysis	<0.0001
Rubella	<0.0001
Lipemia	<0.0001

15.0 BIBLIOGRAFIA

- Dorfman, RI and Shiple, RA, ED: Androgens, New York.: John Wiley and Sons, 1956.
- Horton R, Tait JF: Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of conversion to testosterone. *J.Clin Invest* 45: 301-303, 1966.
- Faiman C and Winter, JSD, Reyes, FI, *Clin Obstet Gynaecol*, 3, 467 (1976).
- Sizonenka, PC, *Pediatrician*, 14, 191 (1987).
- Cummings DC, Wall SR: Non sex hormone binding globulin bound testosterone as a marker for hyperandrogenism. *J. Clin Endocrinol Metab.* 61:873-876, 1985.
- Lashansky, G, et. al., *J Clin Endocrinol Metab*, 58, 674 (1991)
- Tietz, NW, ED: *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. Philadelphia, WA Saunders Co, 1995.
- Smith SW: Free Testosterone, *AACC Endo*; 11(3), 59-62 (1993).

Revision: 3

Date: 082912

DCO: 0785

Product Code: 5325-300

Size	96(A)	192(B)	
Reagent (fill)	A)	1ml set	1ml set
	B)	1 (6ml)	2 (6ml)
	C)	1 (6ml)	2 (6ml)
	D)	1 plate	2 plates
	E)	1 (20ml)	1 (20ml)
	F)	1 (7ml)	2 (7ml)
	G)	1 (7ml)	2 (7ml)
	H)	1 (8ml)	2 (8ml)

For Orders and Inquiries, please contact

Monobind Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630 USA

Tel: +1 949.951.2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.

