



IVD

CE

# Free TESTO-RIA-CT

*KIPI19000*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b> 230123
New logo



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Free Testosterone  
in Human Serum  
KIP19000

en

**IN VITRO DIAGNOSTIC USE. For professional use only**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. INTENDED USE :

For **IN VITRO** determination of Free Testosterone (FT) levels in hirsutism and hypogonadism.

Free testosterone diffuses through cell membranes and binds to specific receptor proteins (androgen receptors); the Testosterone-receptor complexes act as transcriptional modulators on cis-regulatory regions of many genes.

Excess of Androgens in women causes hirsutism and signs of virilization; Testosterone level in serum has to be determined before and after ovarian and adrenal stimulation and suppression to identify the source of excessive hormone production.

Primary and secondary hypogonadism in men result in clinical hypoandrogenization, correlated with the degree of gonadal failure in Testosterone production. The determination of serum Testosterone together with that of LH allows the correct assessment of those conditions.

The diagnosis of true anorchia also requires to discriminate this condition from cryptorchidism. Under prolonged hCG stimulation, Testosterone levels remain very low in true anorchia while cryptorchid testes can respond to stimulation.

Androgen resistance syndromes, due to X linked androgen receptor gene deficiencies, are made of various degrees of sexual ambiguity. Whatever the severity of the phenotypical abnormalities, serum Testosterone is systematically high in regards to elevated LH serum levels in these conditions.

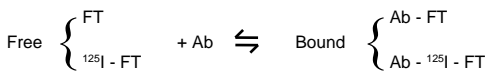
Testosterone assays include total testosterone (direct, extraction, coated tubes) and free testosterone determinations.

Total Testosterone in plasma includes free Testosterone and Testosterone bound to SHBG, albumin, CBG. The mean percentage of each in normal men is 2.7, 32, 65 and <0.1 respectively.

Solvents break the protein binding in extraction assays whereas blocking agents release Testosterone from proteins in direct assays. The advantage of a free testosterone assay is that free testosterone concentrations are in equilibrium with testosterone bound to receptors in the organs.

## 2. PRINCIPLE OF THE METHOD :

The Free Testosterone (FT) CT RIA obeys the law of mass action according to the following equation :



Since the concentrations of  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  and coated antibodies are constant, the advancing state of the equation depends on the concentration of FT. The amount of  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  bound to the coated tube is inversely proportional to the concentration of FT in the sample.

Following the incubation, the tube is aspirated to remove excess unbound labelled T. Patient sample concentrations are read from a calibration curve.

## 3. MATERIAL PROVIDED AND STORAGE :

Stored at 2 - 8°C, the material can be used up to the expiration date printed on each label.

- 3.1. 

--

 2 x 48 Polystyrene tubes (12 x 75 mm) coated with anti-Testosterone polyclonal antibodies. Systematically allow the coated tubes to reach room temperature (18-25°C) before use.
- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 yellow, 42 ml  
1 bottle of  ${}^{125}\text{I}$ -labelled FREE TESTOSTERONE analogue in protein based buffer containing < 0.1 %  $\text{NaN}_3$  as preservative. Each bottle contains less than 185 Kbc ( 5  $\mu\text{Ci}$ )
- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 0.5 ml in each vial - N=0 to 6  
7 vials of FREE TESTOSTERONE in human serum containing preservative ( $\text{NaN}_3 < 0.1 \%$ ). The concentrations are printed on the labels. **(See exact values on vial labels)**
- 3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 vials, lyophilized - N=1 or 2  
2 vials of human plasma containing preservative (Thymol). The controls are to be assayed along with the patient samples. The ranges for the controls are printed on the vial labels. Before use, reconstitute the content of the controls with 0.5 ml of distilled water After reconstitution, the controls should be aliquoted and kept at -20°C for maximum 3 months. **(See exact values on vial labels)**

- 3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x concentrated, 10 ml  
1 bottle concentrated buffered solution containing sodium azide ( $\text{NaN}_3 < 0.1 \%$ ). Pour the solution in 700 ml of distilled water.  
The reconstituted washing solution is stable for 2 weeks at 2-8°C if covered with adhesive film to avoid contamination.

## 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED :

- bench surfaces, protected by absorbent paper to reduce the effects of radioactive spillage.
- waste disposal containers, appropriately labelled and suitable for solid or liquid radioactive materials.
- manual or automated precision micropipettes for dispensing samples or reagents without cross-contamination.
- absorbent paper.
- vacuum pump, connected through a trap, for aspiration.
- water bath.
- a gamma scintillation counter
- appropriate graph paper for plotting the results.

## 5. METHODOLOGY

### 5.1. Collection and handling of blood samples :

The blood sample can be collected into a dry tube. After separation from the red blood cells, serum samples can be assayed immediately, within 24 hours if stored at 2 - 8°C, or later, after a period of up to several months if stored at -20°C. Repeatedly freezing and thawing must be avoided.

### 5.2. Assay procedure :

Reagents stored at 2°- 8° C. must be brought at room temperature (18-25°C) prior to use. Do not mix reagents of different lots. Label the tubes for T (« Total Counts » do not use coated tubes) calibrators, samples and controls. Calibrators and controls should be mixed before use by inverting or swirling rather than vortexing.

Perform the assay in duplicate. Calibrators, controls and samples must be assayed at the same time.

Each tube can only be used once

#### 1. Calibrator curve :

Pipette 50  $\mu\text{l}$  of each calibrator into the corresponding tubes.

#### 2. Samples and controls :

Pipette 50  $\mu\text{l}$  of each sample or control into the corresponding tubes.

3. Add 400  $\mu\text{l}$  of  ${}^{125}\text{I}$  - TESTOSTERONE analogue tracer to each tube. Vortex and cover.

4. Incubate 2 hours at 37  $\pm$  2°C.

5. Carefully aspirate the solution of all tubes. (Except total counts tubes).

6. Add 2 ml of washing solution to each tube. Aspirate carefully. (Except total count tubes).

7. Add 2 ml of washing solution to each tube. Aspirate carefully. (Except total count tubes).

8. Count the radioactivity fixed in each tube for at least 60 seconds

### 5.3. Data processing :

Determine the mean count rate for each set of duplicate tubes.

Calculate the ratio B/B0 as follows :

$$B/B0 \% = \left[ \frac{\text{Cal or Smp cpm}}{B0 (\text{Cal } 0) \text{ cpm}} \right] \times 100$$

Draw the calibrator curve by plotting the ratio B/B0 % (linear scale) obtained for each calibrator versus its respective concentration expressed in pg/ml (logarithmic scale). FREE TESTOSTERONE concentrations in samples can be read directly from the calibrator curve.

If a computer is used to calculate the results, the data can be fitted to the appropriate equation : smoothed spline.

5.4. Example of a typical assay :

	Contents (pg/ml)	cpm 1st duplicate	cpm 2nd duplicate	Mean count rate	B/Bo (%)	Free Testosterone (pg/ml)
Total counts	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0.3	21086	21170	21128	81.6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63.2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31.3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18.8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9.9	-
C 1 low	1.5 – 2.9	13461	13557	13508	52.2	2.3
C 2 high	15 – 29	5736	5002	5369	20.8	21
Sample 1		17478	16742	16975	65.5	0.86
Sample 2		7538	7423	7481	28.9	11.5
Sample 3		4681	4645	4663	24.3	33

Example of a typical assay, do not use for calculations

6. PERFORMANCE CHARACTERISTICS :

6.1. Specificity

Steroid	% Cross-reactivity
Testosterone	100
5 $\alpha$ DHT	0.006
androstenedione	0.02
$\beta$ estradiol	0.0003
DHEA-S	0.000001
Androsterone, Corticosterone, 11 DOC, estriol, estrone, progesterone, DHEA	N.D.

6.2. Detection Limit

The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of these values. The LOB was calculated to be 0.08 pg/ml.

The LOD (limit of detection) was calculated as the LOB - 1.65 standard deviations of a low concentration sample tested in 10 different run. The LOD was calculated to be 0.40 pg/ml.

6.3. Reproducibility :

	Within assay variation		Between assay variation	
	Mean value (pg/ml)	10 replicates (% CV)	Mean value (pg/ml)	7 Separate assays in duplicate (% CV)
Pool 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pool 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pool 3	0,63	11,5	33,94	9,1

7. LIMITATION OF THE PROCEDURE

- The results obtained from this or any other diagnostic kit should be used and interpreted only in the context of an overall clinical picture.
- Do not use lipemic, haemolyzed, icteric or turbid specimens.
- Do not use plasma samples

8. EXPECTED VALUES

It is recommended that each laboratory establishes its own reference values.

Age group	Males			Females		
	Number of subjects	Median pg/ml	Absolute Range pg/ml	Number of subjects	Median pg/ml	Absolute Range pg/ml
<15 years	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39 years	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59 years	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60 years	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

9. WARNING AND PRECAUTIONS

For IN VITRO DIAGNOSTIC use only

CAUTION : Radioactive material

This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS).

WARNING : Sodium azide

Some components contain sodium azide as preservative agent (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Dispose of the reagents by flushing with large amount of water through the plumbing system.

WARNING : Potentially infectious material

Handle all components (and all patient samples) as if capable of transmitting viral diseases such as hepatitis B and C and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Source material derived from human body fluids or organs and used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and anti-HCV by immunoassay. However, no known test can guarantee that such material does not contain the causative agent of viral hepatitis.

Likewise, all human materials used in the preparation of this kit were screened for the presence of antibodies against HIV-1 and -2 by enzyme-immunoassay and were found negative. However, absence of this antibody cannot guarantee the absence of the viral agent responsible for the acquired immunodeficiency syndrome.

10. BIBLIOGRAPHY

- Abraham G., Manlinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner RJ. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings EJ. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

fr

Pour la détermination quantitative de la Free Testosterone  
dans le sérum humain  
KIPI19000

UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO. Pour usage professionnel uniquement

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. Utilisation :** Pour la détermination **IN VITRO** des taux en Testostérone Libre (FT) en cas de hirsutisme et de hypogonadisme.

La testostérone libre se diffuse à travers les membranes cellulaires et se lie à des protéines réceptrices spécifiques (récepteurs androgènes); les complexes récepteurs de Testostérone fonctionnent comme modulateurs de la transcription sur les régions cis-régulatoires de beaucoup de gènes.

Excès d'androgène chez des femmes cause l'hirsutisme et des signes de virilisation; les taux en testostérone dans le sérum doivent être déterminés avant et après la stimulation et la suppression ovariennes et surrénales pour identifier la source de la production excessive d'hormones.

Les hypogonadismes primaire et secondaire chez des hommes résultent en hypoandrogénisation en corrélation avec le degré de déficience gonadique dans la production de testostérone. La détermination de la testostérone sérique ensemble avec celle de la LH permet l'évaluation correcte de ces situations.

Le diagnostic de la vraie anorchie doit aussi distinguer cette situation du cryptorchidisme. Sous stimulation prolongée avec hCG, les taux en testostérone restent très bas en cas de vraie anorchie tandis que des testicules cryptorchides peuvent répondre à la stimulation.

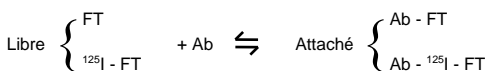
Des syndromes de résistance aux androgènes, dus aux déficiences du gène récepteur d'androgènes lié au chromosome X, sont faits de différents degrés d'ambiguïté sexuelle. Indépendamment de la gravité des anomalies phénotypiques, la testostérone sérique est systématiquement élevée dans ces situations par rapport aux taux en LH élevés.

Les tests pour la testostérone incluent les déterminations de la testostérone totale (directe, extraction, tubes coatés) et de la testostérone libre.

La testostérone totale dans le plasma inclue la testostérone libre et liée au SHBG, à l'albumine, au CBG. Le pourcentage moyen de chacun dans des hommes normaux est respectivement de 2,7,32,65 et <0,1.

Des solvants rompent la liaison protéique dans les tests d'extraction tandis que les réactifs de blocage libèrent la testostérone des protéines dans les tests directs. L'avantage d'un test de testostérone libre est que les concentrations en testostérone libre sont en équilibre avec la testostérone liée aux récepteurs dans les organes.

**2. PRINCIPE DE LA METHODE :** La Free Testostérone (FT) CT RIA obéit à la loi de l'action de masse selon l'équation suivante:



Puisque les concentrations en  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  et les anticorps coatés sont constants, l'état d'avancement de l'équation dépend de la concentration en FT. L'importance de  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  attaché au tube coaté est inversement proportionnelle à la concentration en FT dans l'échantillon.

Après l'incubation, le tube est aspiré afin de retirer l'excès du non attaché marqué T. Les concentrations des échantillons du patient sont lues sur une courbe de calibration.

### 3. MATERIEL FOURNI ET ENTREPOSAGE:

Entreposer à 2 – 8°C, le matériel peut être utilisé jusqu'à la date d'expiration inscrite sur chaque étiquette.

- 3.1 

--

 2 x 48 tubes en Polypropylène (12 x 75 mm) coatés avec des anticorps polyclonaux anti-Testostérone. Systématiquement, permettre aux tubes coatés d'atteindre la température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
- 3.2 

Ag	125I
----	------

 Traceur - Jaune - 42 ml :  
1 flacon  ${}^{125}\text{I}$ -labellé analogue de Testostérone Libre dans un tampon protéique avec un préservateur ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ).  
Chaque flacon contient moins de 185 Kbc (5  $\mu\text{Ci}$ )
- 3.3 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml dans chaque fiole - N=0 à 6  
7 fioles de FREE TESTOSTERONE en sérum humain contenant un préservateur ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ).  
Les concentrations sont indiquées sur les étiquettes.  
**(Voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons)**

- 3.4 

CONTROL	N
---------	---

 2 fioles lyophilisées - N= 1 ou 2  
2 fioles de plasma humain contenant un préservateur (Thymol). Les contrôles doivent être réalisés en même temps que les échantillons des patients. Les valeurs des contrôles sont indiquées sur les étiquettes des fioles.  
Avant utilisation, reconstituer le contenu des contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.  
Après reconstitution, les contrôles devraient être aliquotés et conservés à -20°C pendant maximum 3 mois.  
**(Voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons)**

- 3.5 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x concentré, 10 ml  
1 flacon de solution concentrée et tamponnée contenant de l'azote de sodium ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ). Mettre en solution dans 700 ml d'eau distillée.  
La solution de lavage reconstituée est stable pendant 2 semaines à 2-8 ° C si elle est recouverte d'un film adhésif pour éviter toute contamination.

### 4. MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI:

- Les surfaces de travail doivent être protégées par du papier absorbant afin de réduire les effets des émanations radioactives.
- Containers pour déchets correctement étiquetés et désignés comme étant appropriés pour le matériel radioactif liquide et solide.
- Micropipettes précises soit manuelles soit automatisées pour la préparation des échantillons ou des réactifs sans contamination croisée.
- Papier absorbant.
- Pompe à vide connectée à une trappe pour l'aspiration.
- Bain-marie
- Shaker horizontal (max 350 rpm)
- Un compteur de scintillation gamma.
- Un papier graphique approprié pour calculer les résultats.

### 5. METHODOLOGIE:

- 5.1. Collecte et maniment des échantillons de sang:  
L'échantillon de sang peut être collecté dans un tube sec.  
Après la séparation des globules rouges, les échantillons de sérum peuvent être utilisés immédiatement, dans les 24 heures s'ils sont entreposés à 2 – 8°C ou plus tard, après une période pouvant aller jusqu'à plusieurs mois s'ils sont entreposés à – 20°C. Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées.

- 5.2. Procédure d'analyse:  
Les réactifs entreposés à 2° - 8° C. doivent atteindre la température ambiante (18-25°C) avant toute utilisation. Il ne faut jamais mélanger les réactifs provenant de différents lots. Etiquetter les tubes pour T (« Total Counts » ne pas utiliser de tubes coatés) standards, échantillons et sérums de contrôle. Les standards et les contrôles doivent être mélangés en retournant ou en remuant plutôt qu'en agitant.  
Réaliser les manipulations en double. Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être préparés en même temps.  
Chaque tube ne peut être utilisé qu'une seule fois
1. Courbe standard:  
Pipetter 50  $\mu\text{l}$  de chaque standard dans les tubes correspondants.
2. Echantillons inconnus et contrôles:  
Pipetter 50  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon dans les tubes correspondants.
3. Ajouter 400  $\mu\text{l}$  du traceur  ${}^{125}\text{I}$  – TESTOSTERONE dans chaque tube. Mélanger avec un vortex et couvrir.
4. Incuber 2 heures  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
5. Aspirez soigneusement la solution de tous les tubes. (à l'exception des tubes "Total Counts").
6. Ajouter 2 ml de solution de lavage dans chaque tube. Aspirer soigneusement. (à l'exception des tubes "Total Counts").
7. Ajouter 2 ml de solution de lavage dans chaque tube. Aspirer soigneusement. (à l'exception des tubes "Total Counts").
8. Compter la radioactivité fixée dans chaque tube pendant au moins 60 secondes.

- 5.3. Traitement des données:  
Déterminer la moyenne pour chaque série de tubes.  
Calculer le ratio B/B0 de la manière suivante :  
$$B/B0 \% = [ \text{Std or Smp cpm} / B0 (\text{Std } 0) \text{ cpm} ] \times 100$$
  
Dessiner la courbe standard en traçant le ratio B/B0 % (échelle linéaire) obtenu pour chaque standard versus sa concentration respectivement exprimée en pg/ml (échelle

logarithmique). Les concentrations en FREE TESTOSTERONE peuvent être lues directement à partir de la courbe standard.

Si un ordinateur est utilisé pour calculer les résultats, les données peuvent être ajustées par l'équation appropriée: 4 PL pondéré.

#### 5.4. Exemple d'une courbe typique:

	Contenu (pg/ml)	cpm 1st duplicate	cpm 2nd duplicate	Mean count rate	B/Bo (%)	Free Testosterone (pg/ml)
Activité totale	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1	1,5 - 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2	15 - 29	5736	5002	5369	20,8	21
Echantillon 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Echantillon 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Echantillon 3		4681	4645	4663	24,3	33

Exemple d'une estimation typique, à ne pas utiliser pour les calculs

### 6. Caractéristiques de performance:

#### 6.1. Spécificité:

Stéroïde	% réactions croisées
Testosterone	100
5 $\alpha$ DHT	0,006
androstenedione	0,02
$\beta$ estradiol	0,0003
DHEA-S	0,000001
Androsterone, Corticosterone, 11 DOC, estriol, estrone, progesterone, DHEA	N.D.

#### 6.2. Limite de détection

La LOB (Limite de Blanc) a été calculée en mesurant plusieurs fois le blanc et correspond à la moyenne - 1,65 écart type de la distribution de ces valeurs. La LOB a été calculée à 0,08 pg / ml.

La LOD (limite de détection) a été calculée comme étant le LOB - 1,65 écart-type d'un échantillon à faible concentration testé dans 10 essais différents. La LOD a été calculée à 0,40 pg / ml.

#### 6.3. Reproductibilité:

	Variation intra essai		Variation inter essai	
	Valeur moyenne (pg/ml)	10 replicates (% CV)	Valeur moyenne (pg/ml)	7 essais différents en double (% CV)
Pool 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pool 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pool 3	0,63	11,5	33,94	9,1

### 7. LIMITATION DE LA PROCEDURE:

7.1. Les résultats obtenus à partir de ceci ou de tout autre kit de diagnostic devraient être utilisés et interprétés seulement dans le contexte d'une image clinique globale.

7.2. Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques, hémolysés, ictériques ou troubles .

7.3. Ne pas utiliser d'échantillons plasma

### 8. VALEURS ATTENDUES:

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

Groupes d'âges	Hommes			Femmes		
	Nombre de sujets	Médiane pg/ml	Portée absolue pg/ml	Nombre de sujets	Médiane pg/ml	Portée absolue pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

### 9. DANGERS ET PRECAUTIONS:

#### A utiliser uniquement pour des diagnostics in vitro

##### PRUDENCE: matériel radioactif

Cette trousse contient de  $^{125}\text{I}$  (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS).

##### DANGER: azoture de sodium

Certains composants contiennent de l'acide de sodium comme agent préservatif ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Se débarrasser des réactifs en versant de grande quantité d'eau par le système de plomberie.

##### DANGER: matériel potentiellement infectieux

Manipuler tous les composants (et tous les échantillons des patients) comme s'ils sont capables de transmettre des maladies virales comme l'hépatite B et C et le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA).

Le matériel d'origine provenant d'organes et de liquides du corps humain et utilisé dans la préparation de ce kit ont été testés et ont obtenu des résultats négatifs pour l'hépatite B et C antigène de surface par immunoessai. Cependant, aucun test connu ne peut garantir qu'un tel matériel ne contient pas d'agent causatif d'hépatites virales.

De plus, tous les matériels humains utilisés dans la préparation de ce kit ont été examinés afin de déterminer la présence d'anticorps HIV-1 et 2 et ont obtenu des résultats négatifs par immunoessai enzymatique. Cependant, l'absence de cet anticorps ne peut pas garantir l'absence d'un agent viral responsable du syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA).

### 10. BIBLIOGRAPHY

1. Abraham G., Manlino F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
2. Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
3. Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
4. Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
5. Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
6. Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
7. Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
8. Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Testosteron in Humanserum

KIPI19000

IN VITRO DIAGNOSTIC USE. Nur für professionelle Anwendung

de

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. VERWENDUNGSZWECK: IN VITRO Bestimmung der Werte von freiem Testosteron (FT) bei Hirsutismus und Hypogonadismus.

Freies Testosteron diffundiert durch Zellmembranen und wird an spezifische Rezeptorproteine (Androgenrezeptoren) gebunden; die Testosteron-Rezeptor-Komplexe agieren als Transkriptionsmodulatoren auf cis-regulatorische Sequenzen vieler Gene.

Überhöhte Mengen an Androgenen bei Frauen verursachen Hirsutismus und Zeichen einer Virilisierung; der Serumtestosteronspiegel muss vor und nach ovarialer und adreneraler Stimulierung und Suppression bestimmt werden, um den Ursprung der überhöhten Hormonproduktion zu identifizieren.

Primärer und sekundärer Hypogonadismus bei Männern führen zu klinischer Hypoandrogenisierung, die mit dem Grad des Gonadenversagens bei der Testosteronproduktion in Zusammenhang steht. Die kombinierte Bestimmung von Serumtestosteron und LH erlaubt die korrekte Beurteilung dieser Erkrankungen.

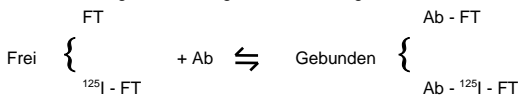
Die Diagnose einer echten Anarchie erfordert die Differenzierung dieser Erkrankung vom Kryptorchismus. Unter verlängerter hCG-Stimulierung bleibt der Testosteronspiegel bei echter Anarchie sehr niedrig, während die Testes bei Kryptorchismus auf die Stimulierung reagieren können.

Androgenresistenzsyndrome aufgrund X-gebundener Androgenrezeptor-Gendefizienzen umfassen verschiedene Grade geschlechtlicher Ambiguität. Ungeachtet der Schwere der phänotypischen Anomalien ist das Serumtestosteron bei diesen Erkrankungen in Bezug auf die erhöhten LH-Serumwert systematisch erhöht.

Testosteronassays umfassen die Bestimmungen von Gesamttestosteron (direkt, Extraktion, beschichtete Röhrchen) und freiem Testosteron. Gesamttestosteron im Plasma umfasst freies Testosteron und an SHBG, Albumin, CBG gebundenes Testosteron. Die jeweiligen Mittelwerte beim gesunden Mann sind respektive 2,7, 32, 65 und < 0,1.

In Extraktionsassays brechen Lösungsmittel die Proteinbindung auf, während in direkten Assays Blocker Testosteron von Proteinen freisetzen. Der Vorteil eines freien Testosteron-Assays besteht darin, dass die Konzentrationen an freiem Testosteron sich mit dem in den Organen an Rezeptoren gebundenen Testosteron im Gleichgewicht befinden.

## 2. TESTPRINZIP: Der freies Testosteron (FT) CT RIA unterliegt dem Gesetz der Massenwirkung nach der folgenden Gleichung:




Da die Konzentrationen an <sup>125</sup>I - FT und beschichteten Antikörpern konstant sind, hängt der Fortgang der Gleichung von der Konzentration von FT ab. Die Menge an <sup>125</sup>I - FT, die an die beschichteten Röhrchen gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur FT-Konzentration in der Probe.

Nach der Inkubation wird das Röhrchen aspiriert, um Überschüsse an nicht gebundenem markiertem T zu entfernen.

Die Konzentrationen der Patientenproben werden aus einer Standardkurve abgelesen.

## 3. MITGELIEFERTES MATERIAL UND LAGERUNG:

Bei Lagerung bei 2 - 8°C kann das Material bis zum Verfalldatum verwendet werden, das auf jedes Etikett gedruckt ist.

- 3.1.  2 x 48 Polypropylenröhrchen (12 x 75 mm), beschichtet mit polyklonalen Anti-Testosteron Antikörpern.  
Vor Gebrauch müssen die beschichteten Röhrchen Raumtemperatur (18-25°C) erreicht haben.
- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 Gelb, 42 ml.  
1 Flasche mit <sup>125</sup>I-markiertem Freies Testosteron-Analog in einem Proteinpuffer mit Konservierungsmittel (NaN<sub>3</sub> < 0,1%).  
Jede Flasche enthält weniger als 185 kBq (5 µCi).
- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml in jedem Gefäß - N = 0 bis 6.  
7 Gefäße FREIES TESTOSTERON in Humanserum mit Konservierungsmittel (NaN<sub>3</sub> < 0,1%).  
Die Konzentrationen sind auf den Etiketten angeführt.  
**(Siehe genaue Werte auf den Fläschchenetiketten)**
- 3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 Fläschchen, lyophilisiert - N = 1 oder 2.  
2 Gefäße Humanplasma mit Konservierungsmittel (Thymol). Die Kontrollen müssen gemeinsam mit den Patientenproben im Assay getestet werden. Die Bereiche für die Kontrollen sind auf die Gefäßetiketten gedruckt.  
Vor dem Gebrauch müssen die Inhalte der Kontrollen mit 0,5 ml destilliertem Wasser rekonstituiert werden.  
Nach dem Auflösen müssen die Kontrollen portioniert und bei -20°C eingefroren werden. Bei -20°C sind die Kontrollen für maximal 3 Monate stabil.  
**(Siehe genaue Werte auf den Fläschchenetiketten)**

- 3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

70 x konzentriert, 10 ml.  
1 Flasche konzentrierte Pufferlösung mit Natriumazid (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Lösung in 700 ml destilliertes Wasser gießen.  
Die rekonstituierte Waschlösung ist bei 2-8 ° C 2 Wochen haltbar, wenn sie mit einem Klebefilm bedeckt ist, um eine Kontamination zu vermeiden.

## 4. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT MITGELIEFERT):

- Schutz für Arbeitstischoberflächen durch Saugpapier, um die Wirkung verschütteter radioaktiver Substanzen zu reduzieren.
- Geeignet gekennzeichnete Abfallbehälter für feste oder flüssige radioaktive Materialien.
- Manuelle oder automatisierte Präzisions-Mikropipetten zum Pipettieren von Proben oder Reagenzien ohne Kreuzkontamination.
- Saugpapier.
- Vakuumpumpe, verbunden über eine Falle, zum Absaugen.
- Wasserbad.
- Gegenlauf- oder Orbitalschüttler (max. 350 Upm).
- Gammazintillationszähler.
- Geeignetes Millimeterpapier zum Auftragen der Resultate.

## 5. METHODIK:

- 5.1. Gewinnung und Handhabung von Blutproben:  
Die Blutprobe kann in ein trockenes Röhrchen eingebracht werden.  
Nach der Trennung von den roten Blutkörperchen können Serumproben sofort getestet werden, bei Lagerung bei 2 - 8°C innerhalb von 24 Stunden oder bei Lagerung bei -20°C noch später, nach einem Zeitraum von bis zu mehreren Monaten. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

5.2. Testdurchführung:

Bei 2 - 8°C gelagerte Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht vermischen. Röhrchen für T (Total Counts - Gesamt' keine beschichteten Röhrchen verwenden), Kalibratoren, Proben und Kontrollen beschriften. Kalibratoren und Kontrollen sollten vor Gebrauch eher durch Umdrehen oder Drehen als durch Vortexen gemischt werden.

Assay doppelt ausführen. Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen zugleich getestet werden.

Jede Tube kann nur einmal verwendet werden

1. Kalibratorkurve:  
50 µl jedes Kalibrators in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.

2. Proben und Kontrollen:  
50 µl jeder Probe oder jedes Kontroll in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.

3. 400 µl <sup>125</sup>I - TESTOSTERON Analogtracer in jedes Röhrchen zupipettieren. Vortexen und abdecken.

4. 2 Stunden bei 37°C ± 2°C inkubieren.

5. Saugen Sie die Lösung aller Röhrchen vorsichtig ab (außer Röhrchen T)

6. 2 ml Waschlösung in jedes Röhrchen zupipettieren. Sorgfältig absaugen. (außer Röhrchen T)

7. 2 ml Waschlösung in jedes Röhrchen zupipettieren. Sorgfältig absaugen. (außer Röhrchen T)

8. In jedem Röhrchen fixierte Radioaktivität mindestens 60 Sekunden zählen.

- 5.3. Datenverarbeitung:  
Mittlere Zählrate für jedes Röhrchenpaar bestimmen.  
Verhältnis B/B0 folgendermaßen bestimmen:

$$B/B0 \% = [ \text{Cal oder Prb cpm} / B0 (\text{Cal } 0) \text{ cpm} ] \times 100$$

Kalibratorkurve auf zeichnen, indem das für jeden Kalibrator erhaltene Verhältnis B/B0 % (linear) gegenüber seiner jeweiligen in pg/ml ausgedrückten Konzentration (logarithmisch) aufgetragen wird. FREIES TESTOSTERON-Konzentrationen in den Proben können direkt aus der Kalibratorkurve abgelesen werden.  
Wenn zur Berechnung der Resultate ein Computer verwendet wird, können die Daten in die geeignete Gleichung eingebracht werden: 'Smoothed Spline'.



#### 5.4. Beispiel eines typischen Assay:

	Inhalt (pg/ml)	cpm 1. Duplikat	cpm 2. Duplikat	Mittlere Zählrate	B/Bo (%)	Freies Testosteron (pg/ml)
Gesamt	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 niedrig	1,5 – 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 hoch	15 – 29	5736	5002	5369	20,8	21
Probe 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Probe 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Probe 3		4681	4645	4663	24,3	33

Beispiel eines typischen Assay, nicht für Berechnungen verwenden.

## 6. LEISTUNGSMERKMALE:

### 6.1. Spezifität:

Steroid	% Kreuzreaktivität
Testosteron	100
5 $\alpha$ -DHT	0,006
Androstendion	0,02
$\beta$ -Östradiol	0,0003
DHEA-S	0,000001
Androsteron, Kortikosteron, 11 DOC, Östriol, Östron, Progesteron, DHEA	N.D

### 6.2. Nachweisgrenze:

Die Leerwert-Grenze (LOB) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und ist definiert als Mittelwert, abzüglich der 1,65-fachen Standardabweichung der Mehrfachmessung des Leerwertes. Das LOB wird mit 0,08 pg/ml berechnet.

Die LOD (Nachweisgrenze) wurde als LOB - 1,65 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Assays getestet wurde, berechnet. Die LOD wird mit 0,40 pg / ml berechnet.

### 6.3. Vergleichspräzision:

	Intra-Assay-Variation		Inter-Assay-Variation	
	Mittelwert (pg/ml)	10 Wiederholungen (% CV)	Mittelwert (pg/ml)	7 getrennte Assays in Duplikat (% CV)
Pool 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pool 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pool 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. GRENZEN DES VERFAHRENS:

- Die durch diesen oder jeden anderen diagnostischen Testkit erhaltenen Resultate sollten nur im Kontext eines klinischen Gesamtbildes verwendet und interpretiert werden.
- Keine lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder getrübbten Proben verwenden.
- Keine Plasmaproben verwenden.

## 8. ERWARTETE WERTE:

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte erstellt.

Altersgruppe	Männer			Frauen		
	Anzahl der Personen	Median pg/ml	Absolute Bereich pg/ml	Anzahl der Personen	Median pg/ml	Absolute Bereich pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN:

### Nur zur Verwendung in der IN VITRO DIAGNOSE!

#### VORSICHT: Radioaktives Material

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und y (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

#### WARNUNG: Natriumazid

Einige Komponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Reagenzien durch Spülen mit reichlich Wasser über die Kanalisation entsorgen.

#### WARNUNG: Potenziell infektiöses Material

Gehen Sie mit allen Komponenten (und allen Patientenproben) so um, als ob sie virale Erkrankungen wie Hepatitis B und C und AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) übertragen könnten.

Ausgangsmaterial aus menschlichen Körperflüssigkeiten oder Organen, die bei der Vorbereitung dieses Kits verwendet wurden, wurden getestet und für HBsAg und Anti-HCV durch Immunoassay für negativ befunden. Kein bekannter Test kann jedoch garantieren, dass solches Material nicht den Erreger viraler Hepatitis enthält.

Ebenso wurden alle Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Vorbereitung dieses Kits verwendet wurden, durch Enzym-Immunoassay auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen HIV-1 und -2 getestet und für negativ befunden. Die Abwesenheit dieses Antikörpers kann jedoch nicht die Abwesenheit des viralen Erregers garantieren, der für AIDS verantwortlich ist.

## 10. LITERATUR:

- Abraham G., Manlinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay. Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977.
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983.
- Green P.J. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982.
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulphate. Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981.
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981.



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Test radioimmunologico per la determinazione quantitativa di Testosterone libero nel siero umano

KIPI19000

USO DIAGNOSTICO IN VITRO. Solo per uso professionale

it

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. USO PREVISTO:** Per la determinazione **IN VITRO** di livelli di Testosterone libero (FT) nell'irsutismo e nell'ipogonadismo.

Il testosterone libero si diffonde attraverso le membrane cellulari e si lega a specifiche proteine recettoriali (recettori androgeni); i complessi recettoriali del testosterone agiscono come modulatori di trascrizione nelle regioni di cis-regolazione di numerosi geni.

Un eccesso di androgeni nelle donne è causa di irsutismo e di segni di virilizzazione; il livello di testosterone nel siero deve essere determinato prima e dopo la stimolazione e la soppressione surrenale e ovarica per identificare l'origine dell'eccessiva produzione di ormone.

L'ipogonadismo primario e secondario negli uomini comporta l'ipoandrogenizzazione clinica correlata al grado di insufficienza gonadica nella produzione di testosterone. La determinazione del testosterone del siero unitamente alla determinazione di LH consente di valutare correttamente queste condizioni.

Per giungere alla effettiva diagnosi di anorchia è necessario differenziare la presente condizione dal criptorchidismo. In presenza di una stimolazione prolungata di hCG, i livelli di testosterone rimangono molto bassi in caso di anorchia effettiva, mentre i testicoli del criptorchide possono rispondere alla stimolazione.

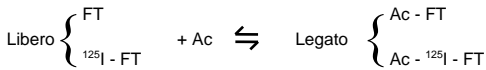
Le sindromi da resistenza agli androgeni, dovute ad insufficienze dei geni recettoriali per gli androgeni associati alla X, sono composte da diversi livelli di ambiguità sessuale. Qualunque sia la gravità delle anomalie fenotipiche, il testosterone del siero risulta sistematicamente elevato tenuto conto dei livelli sierici elevati di LH riscontrabili in queste condizioni.

I test per il testosterone includono le determinazioni del testosterone totale (diretto, per estrazione, provette rivestite) e del testosterone libero.

Il testosterone totale nel plasma comprende il testosterone libero ed il testosterone legato a SHBG, albumina, CBG. La percentuale media di ognuno negli uomini normali risulta, rispettivamente, pari a 2,7, 32, 65 e < 0,1.

I solventi rompono il legame proteico nei test per estrazione, mentre nei test diretti gli agenti bloccanti liberano il testosterone dalle proteine. Il vantaggio di un test per il testosterone libero consiste nel fatto che le concentrazioni di testosterone libero sono proporzionali al testosterone legato ai recettori negli organi.

**2. PRINCIPIO DEL METODO:** Il Testosterone libero (FT) RIA CT obbedisce alla legge dell'azione di massa conformemente alla seguente equazione :



Dal momento che le concentrazioni di  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  e di anticorpi rivestiti sono costanti, l'andamento dell'equazione dipende dalla concentrazione di FT. La quantità di  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  legata alla provetta rivestita è inversamente proporzionale alla concentrazione di FT presente nel campione.

Dopo l'incubazione, la provetta viene aspirata per rimuovere l'eccesso di T etichettato non legato.

La concentrazione del campione paziente viene letta da una curva di calibrazione.

### 3. MATERIALE IN DOTAZIONE E RELATIVA CONSERVAZIONE:

Se conservato a 2-8°C, il materiale potrà essere utilizzato fino alla data di scadenza impressa su ciascuna etichetta.

3.1. 

--

 2 x 48 provette in polipropilene (12 x 75 mm) rivestite con anticorpi policlonali anti-testosterone. Lasciare sempre che le provette rivestite si portino a temperatura ambiente (18-25°C) prima di utilizzazione.

3.2. 

Ag	125I
----	------

 giallo, 42 ml  
1 flacone di TESTOSTERONE Libero analogo etichettato  ${}^{125}\text{I}$  in in tampone proteico con un conservante (NaN3 < 0,1 %).  
Ogni flacone contiene meno di 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ )

3.3. 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml in ciascuna fiala - N = da 0 a 6  
7 fiale di TESTOSTERONE LIBERO in siero umano contenenti conservante (NaN3 < 0,1 %).  
Le concentrazioni sono stampate sulle etichette.  
**(Vedi i valori esatti sulle etichette dei flaconcini)**

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 flaconi, liofilizzati - N=1 o 2  
2 fiale di plasma umano contenenti conservante (Timolo). I controlli sono stati testati insieme ai campioni paziente. I range relativi ai controlli sono impressi sull'etichetta delle fiale.  
Prima dell'uso, ricostituire il contenuto dei controlli con 0,5 ml di acqua distillata.  
Dopo la ricostituzione, i controlli devono essere aliquotati e dovrebbero essere mantenuti a -20 ° C per un massimo di 3 mesi.  
**(Vedi i valori esatti sulle etichette dei flaconcini)**

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x concentrato, 10 ml  
1 flacone di soluzione tamponata concentrata contenente sodio azide (NaN3 < 0,1 %). Versare la soluzione in 700 ml di acqua distillata.  
La soluzione di lavaggio ricostituita è stabile per 2 settimane a 2-8 ° C se coperta con un film adesivo per evitare la contaminazione.

### 4. MATERIALI RICHIESTI MA NON IN DOTAZIONE:

- superfici di banco protette con carta assorbente per ridurre gli effetti in caso di versamento di sostanze radioattive.
- contenitore per smaltimento dei rifiuti appositamente etichettato ed adatto ai materiali radioattivi solidi o liquidi.
- micropipette di precisione manuali o automatiche per l'erogazione di campioni o reagenti senza possibilità di contaminazione crociata.
- carta assorbente.
- pompa a vuoto per aspirazione collegata tramite un sifone intercettatore
- Bagnomaria
- Agitatore a stantuffo oppure orbitale (max. 350 giri al minuto).
- un contatore gamma a scintillazione
- carta millimetrata idonea per tracciare i grafici dei risultati.

### 5. METODOLOGIA:

#### 5.1. Raccolta e manipolazione dei campioni di sangue:

Il campione di sangue può essere raccolto in una provetta asciutta.

Dopo la separazione dai globuli rossi, sarà possibile testare i campioni di siero immediatamente, nell'arco delle 24 ore se conservati a 2-8°C oppure dopo molti mesi se conservati a -20°C. È necessario evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

#### 5.2. Procedimento del test:

Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente (18-28°C) i reagenti conservati a 2-8°C. Non miscelare reagenti provenienti da lotti diversi. Etichettare le provette dei calibratori T (« Conteggi totali » non utilizzare provette rivestite), campioni e controlli. I calibratori e i controlli devono essere mescolati prima dell'uso capovolgendoli oppure muovendoli vorticosamente piuttosto che agitandoli in vortex.

Ogni tubo può essere utilizzato una sola volta

Eseguire il test in duplicato. Eseguire il test contemporaneamente a calibratori, controlli e campioni.

#### 1. Curva di calibrazione:

Pipettare 50  $\mu\text{l}$  di ciascun calibratore nelle provette corrispondenti.

#### 2. Controlli e campioni:

Pipettare 50  $\mu\text{l}$  di ciascun campione o dei controlli nelle provette corrispondenti.

3. Aggiungere a ciascuna provetta 400  $\mu\text{l}$  di TESTOSTERONE  ${}^{125}\text{I}$  tracciante analogo. Agitare in vortex e coprire.

4. Incubare per 2 ore a 37  $\pm$  2°C.

5. Aspirare con cautela la soluzione di tutte le provette. (eccetto le provette dei conteggi totali).

6. Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di soluzione di lavaggio. Aspirare con cautela. (eccetto le provette dei conteggi totali).

7. Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di soluzione di lavaggio. Aspirare con cautela. (eccetto le provette dei conteggi totali).

8. Contare la radioattività fissata in ciascuna provetta per almeno 60 secondi (Cpm = Conta per minuto)

### 5.3. Elaborazione dei dati:

Determinare l'indice medio di conteggio relativo a ogni serie di provette in duplicato. Calcolare il rapporto B/B0 procedendo come segue:

$$B/B0 \% = [ \text{Cpm Cal o Camp.} / \text{Cpm B0 (Cal 0)} ] \times 100$$

Disegnare la curva di calibrazione il rapporto B/B0 % (scala lineare) ottenuto per ogni raffronto calibratore/rispettiva concentrazione, espresso in pg/ml (scala logaritmica). Le concentrazioni di TESTOSTERONE LIBERO nei campioni possono essere lette direttamente dalla curva di calibrazione.

Se si utilizza un computer per calcolare i risultati, i dati potranno essere inseriti alla seguente equazione: spline smussata.

### 5.4. Esempio di test tipico:

	Contenuto (pg/ml)	1° cpm duplicato	2° cpm duplicato	Media indice conteggio	B/B0 (%)	Testosterone libero (pg/ml)
Conteggi totali	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 basso	1,5 - 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 alto	15 - 29	5736	5002	5369	20,8	21
Campione 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Campione 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Campione 3		4681	4645	4663	24,3	33

Esempio di test tipico, da non utilizzare per i calcoli

## 6. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE:

### 6.1. Specificità

Steroidi	% Reattività crociata
Testosterone	100
5 $\alpha$ DHT	0.006
androstenedione	0.02
? estradiolo	0.0003
DHEA-S	0.00001
Androsterone, Corticosterone, 11 DOC, estriolo, estrone, progesterone, DHEA	N.D.

### 6.2. Sensibilità:

Il LOB (White Limit) è stato calcolato misurando il bianco più volte ed è la media - 1,65 deviazione standard della distribuzione di questi valori. Il LOB è calcolato a 0,08  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

Il LOD (limite di rilevamento) è stato calcolato come la deviazione standard LOB - 1,65 di un campione a bassa concentrazione testato in 10 diversi dosaggi. Il LOD è calcolato a 0,40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

### 6.3. Riproducibilità:

	Variabilità intra saggio		Variabilità inter saggio	
	Valore medio (pg/ml)	10 repliche (% CV)	Valore medio (pg/ml)	7 test separati in duplicato (% CV)
Gruppo 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Gruppo 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Gruppo 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA:

7.1. Utilizzare e interpretare i risultati ottenuti con questo o con qualsiasi altro kit diagnostico esclusivamente nell'ambito di un quadro clinico generale.

7.2. Non utilizzare campioni lipemici, emolizzati, itterici o torbidi.

7.3. Non utilizzare campioni di plasma

## 8. VALORI ATTESI:

Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire i propri valori di riferimento.

gruppo età	Maschi			Femmine		
	numero di persone	Mediana pg/ml	Intervallo assoluto pg/ml	numero di persone	Mediana pg/ml	Intervallo assoluto pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. AVVERTENZE E PRECAUZIONI:

### Solo per uso DIAGNOSTICO IN VITRO

#### ATTENZIONE: Materiale radioattivo

Il kit contiene  $^{125}\text{I}$  (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

#### AVVERTENZA: Sodio azide

Alcuni componenti contengono sodio azide come agente conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Smaltire i reagenti attraverso il sistema idraulico risciacquando abbondantemente con acqua corrente.

#### AVVERTENZA: Materiali potenzialmente infettivi

Maneggiare tutti i componenti (e tutti i campioni paziente) alla stregua di sostanze in grado di trasmettere malattie quali epatite B e C e sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS).

Il materiale di origine ottenuto da liquidi corporei umani o da organi utilizzato per la preparazione del presente kit è stato testato ed è risultato, a seguito di test immunologico, negativo all'HbsAg e anti-HCV. Ciononostante nessun test noto è in grado di escludere completamente l'assenza da detti materiali di agenti in grado di provocare epatite virale.

Allo stesso modo tutti i materiali umani utilizzati nella preparazione del presente kit, sono stati analizzati, tramite test immunoenzimatico, per rilevare la presenza di anticorpi anti HIV 1 e HIV 2 e sono risultati negativi. Ciononostante, l'assenza di questo anticorpo non è in grado di garantire la completa assenza di agenti virali responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita.

## 10. BIBLIOGRAFIA:

1. Abraham G., Manlino F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977.
2. Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983.
3. Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982.
4. Hanning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981.
5. Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
6. Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
7. Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
8. Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981.



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de la Testosterona Libre en Suero Humano

KIPI19000

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. Solo para uso profesional

es

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. USO :

Para la determinación **IN VITRO** de los niveles de Testosterona Libre (FT) en hirsutismo y hipogonadismo.

La testosterona libre se difunde a través de las membranas celulares y se liga a proteínas receptoras específicas (receptores andrógenos); los complejos receptores de testosterona funcionan como moduladores transcripcionales en regiones cis-reguladores de muchos genes.

Exceso de andrógenos en mujeres causa hirsutismo y señales de virilización; El nivel de testosterona en suero debe ser determinado antes y después del estímulo y de la supresión ováricos y suprarrenales para identificar el origen de la producción hormonal excesiva.

Los hipogonadismos primario y secundario en hombres resultan en hipoandrogenización clínica, correlativa con el grado de falla renal en la producción de testosterona. La determinación de testosterona en suero con la determinación de LH permite la evaluación correcta de estas condiciones.

El diagnóstico de anorquidia genuina también necesita la distinción entre esta condición y la criptorquidia. Con estímulo prolongado de hCG, los niveles de testosterona quedan muy bajos en anorquidia genuina mientras que testículos criptorquídicos pueden responder al estímulo.

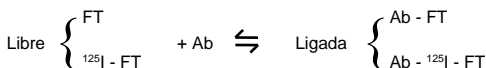
Síndromes de resistencia al andrógeno, debidos a deficiencias del gene receptor del andrógeno ligado al cromosoma X, son hechos de varios grados de ambigüedad sexual. Independientemente de la gravedad de las anomalías fenotípicas, la testosterona en el suero es sistemáticamente elevada en proporción con niveles elevados de LH en suero en estas condiciones.

Ensayos para testosterona incluyen determinaciones de la testosterona total (directa, extracción, tubos recubiertos) y libre.

La testosterona en plasma total incluye la testosterona libre y la testosterona ligada al SHBG, a la albumina, al CBG. El porcentaje medio de cada uno en hombres normales es respectivamente de 2.7, 32, 65 y <0.1.

Solventes rompen la ligación proteica en ensayos de extracción mientras que reactivos de bloqueo liberan la testosterona de las proteínas en ensayos directos. La ventaja de un ensayo para testosterona es que las concentraciones de testosterona libre están en equilibrio con la testosterona ligada a los receptores en los órganos.

## 2. PRINCIPIOS DEL MÉTODO : El Free Testosterone (FT) CT RIA obedece al ley de la acción de masa según la siguiente ecuación :




Visto que las concentraciones de la  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  y de los anticuerpos recubiertos son constantes, la evolución de la ecuación depende de la concentración de FT. La cantidad de  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  ligada al tubo recubierto es inversamente proporcional a la concentración de FT en la muestra.

Después de la incubación, el tubo es aspirado para quitar la T no ligada restante.

Las concentraciones de las muestras de los pacientes se leen de una curva de calibración.

## 3. MATERIAL SUMINISTRADO Y PRESERVACIÓN:

Guardado a 2 - 8°C, el material puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en cada etiqueta.

3.1.  2 x 48 tubos de polipropileno (12 x 75 mm) recubiertos con anticuerpos policlonales anti-Testosterona. Permitir sistemáticamente que los tubos recubiertos alcancen temperatura ambiente (18-25°C) antes de su empleo.

3.2. 

Ag	125I
----	------

 amarillo, 42 ml  
1 botella de análogo TESTOSTERONA Libre marcada con  ${}^{125}\text{I}$  en tampón con proteína y un preservativo (NaN<sub>3</sub>< 0.1 %).  
Cada botella contiene menos de 185 Kbc ( 5 µCi)

3.3. 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml en cada pomo - N=0 a 6  
7 pomos de TESTOSTERONA LIBRE en suero humano conteniendo un preservativo (NaN<sub>3</sub>< 0.1 %).  
Las concentraciones están indicadas en las etiquetas.  
**(Ver valores exactos en las etiquetas de los viales)**

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 viales, liofilizados - N=1 or 2  
2 pomos de plasma humano contiendo un preservativo (Timol). Los controles deben ser probados al mismo tiempo que los muestras de los pacientes. Los alcances para los controles están indicados en las etiquetas de los pomos.  
Antes de usar, reconstituya el contenido de los controles con 0.5 ml de agua destilada.  
Después de la reconstitución, los controles deben ser en alícuotas y se deben mantenerse a -20 ° C durante un máximo de 3 meses.  
**(Ver valores exactos en las etiquetas de los viales)**

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 concentración x 70, 10 ml  
1 vial de solución de lavado concentrada que contiene NaN<sub>3</sub> < 0.1 %. Trasvasar la solución en 700 ml de agua destilada.  
La solución de lavado reconstituida es estable durante 2 semanas a 2-8 ° C si se cubre con una película adhesiva para evitar la contaminación.

## 4. MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO :

- Superficies de banco, protegido por papel secante para reducir los efectos del excedente radiactivo.
- Contenedores de residuos, marcados convenientemente y aptos para materiales radiactivos sólidos o líquidos.
- Micropipetas manuales o automáticas para dispensar las muestras o los reactivos sin contaminación cruzada.
- Papel secante.
- Bomba de vacío, vinculada por una válvula, para la aspiración.
- Baño María
- Agitador recíprocante o orbital (max. 350 rpm).
- Un contador de radiaciones gama
- Papel gráfico apropiado para indicar los resultados.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Colección y maneja de las muestras de sangre :

La muestra de sangre puede ser coleccionada en un tubo seco.

Después de la separación de los globules rojos, las muestras de suero pueden ser probadas inmediatamente, en 24 horas si se guardan a 2 - 8°C, o más tarde, después de un período de unos meses se se guardan a -20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

### 5.2. Procedimiento del ensayo :

Los reactivos guardados a 2°- 8° C. deben ser a temperature ambiente antes del uso. No mezclar reactivos de series diferentes. Marcar los tubos para T (« Cuentas Totales » no utilizar tubos recubiertos) calibradores, muestras y controles. Los calibradores y controles deben ser mezclados antes del uso por inversión o rotación ; no vortexear.

Hacer el ensayo en duplicado. Calibradores, controles y muestras deben ser probados a la misma hora.

Cada tubo solo se puede usar una vez

#### 1. Curva de calibración :

Pipetar 50 µl de cada calibrador en los tubos apropiados.

#### 2. Muestras y controles :

Pipetar 50 µl de cada muestra o control en los tubos apropiados.

3. Añadir 400 µl de trazador análogo de  ${}^{125}\text{I} - \text{TESTOSTERONA}$  a cada tubo. Mezclar con un vortex y cover.

4. Incubar 2 horas a 37 ± 2°C.

5. **Prudentemente** aspirar la solución de cada tubo. (Excepto los tubos de cuentas totales)

6. Añadir 2 ml de solución de lavado a cada tubo. Aspirar prudentemente. (Excepto los tubos de cuentas totales)

7. Añadir 2 ml de solución de lavado a cada tubo. Aspirar prudentemente. (Excepto los tubos de cuentas totales)

8. Contar la radiactividad fijada en cada tubo durante al menos 60 segundos.

### 5.3. Procesamiento de los datos :

Determinar la proporción de recuento media para cada juego de tubos en duplicado. Calcular la razón B/B0 según :

$$B/B0 \% = [ \text{Cal o Smp cpm} / B0 (\text{Cal } 0) \text{ cpm} ] \times 100$$

Hacer la curva de calibración por la realización de la razón B/B0 % (escala lineal) obtenida para cada calibrador frente a su concentración respectiva expresada en pg/ml (escala logarítmica).

Las concentraciones de TESTOSTERONA LIBRE en las muestras se pueden leer directamente de la curva de calibración.

Si se utilice un ordenador para calcular los resultados, los datos pueden ser utilizados en la ecuación apropiada: spline suavizado.

### 5.4. Ejemplo de un ensayo típico :

	Contenidos (pg/ml)	cpm 1 duplicado	cpm 2 duplicado	Proporción de recuento media	B/B0 (%)	Free Testosterone (pg/ml)
Cuentas totales	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 bajo	1,5 - 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 elevado	15 - 29	5736	5002	5369	20,8	21
Muestra 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Muestra 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Muestra 3		4681	4645	4663	24,3	33

Ejemplo de un ensayo típico, no utilizar para cálculos

## 6. CARACTERÍSTICOS DEL ENSAYO :

### 6.1. Especificidad

Esteroides	% Reactividad cruzada
Testosterona	100
5 $\alpha$ DHT	0.006
Andostenediona	0.02
$\beta$ estradiol	0.0003
DHEA-S	0.000001
Androsterona, Corticosterona, 11 DOC, estríol, estrona, progesterona, DHEA	N.D.

### 6.2. Límite de detección:

El LOB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco varias veces y corresponde a la media - 1.65 desviación estándar de la distribución de estos valores. El LOB se calcula a 0.08 pg / ml.

El LOD (límite de detección) se calculó como la LOB - 1.65 desviación estándar de una muestra de baja concentración analizada en 10 ensayos diferentes. LOD se calcula en 0.40 pg / ml.

### 6.3. Reproducibilidad :

	Dentro de la variación del ensayo		Entre la variación del ensayo	
	Valor medio (pg/ml)	10 réplicas (% CV)	Valor medio (pg/ml)	7 ensayos separados en duplicado (% CV)
Serie 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Serie 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Serie 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1. Los resultados obtenidos de este o otro ensayo diagnóstico deben ser utilizados e interpretados solamente en el contexto de una vista clínica general.

7.2. No utilizar especímenes lipémicos, hemolizados, ictericos o turbios.

7.3. No utilizar muestras plasmáticas

## 8. VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Grupo de edad	Hombres			Mujeres		
	número de personas	Media pg/ml	Alcance absoluto pg/ml	número de personas	Media pg/ml	Alcance absoluto pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### Para uso solo en diagnóstico IN VITRO

#### ADVERTENCIA : material radiactivo

Este kit contiene I<sup>125</sup> (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS).

#### ADVERTENCIA : Azida sódica

Unos componentes contienen azida sódica como preservativo (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Tirar los reactivos con abundante agua en el alcantarillado.

#### ADVERTENCIA : Material potencialmente infeccioso

Manejar cada componente del ensayo (y cada muestra de paciente) como transmisor potencial de enfermedades virales como hepatitis B y C y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Los componentes derivados de fluidos o órganos humanos utilizados en la preparación de este ensayo han sido probados por inmunoensayo dando negativo a HBsAg y anti-HCV. Sin embargo, no se conoce ningún método que asegure que este material no contiene la causa de hepatitis viral.

Asimismo, cada componente humano utilizado en la preparación de este ensayo ha sido probado por inmunoensayo enzimático dando negativo a la presencia de anticuerpos anti-HIV-1 y -2. No obstante, la ausencia de este anticuerpo no puede garantizar la ausencia de un componente viral responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abraham G., Manlinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green P.J. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Radioimunoensaio para Determinação Quantitativa de Testosterona Livre em Soro Humano

KIPI19000

pt

Uso para Diagnóstico "IN VITRO". Apenas para uso profissional

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. Intenção de uso :

Para determinação "IN VITRO" dos níveis de Testosterona Livre (FT) em hirsutismo e hipogonadismo.

A Testosterona livre difunde-se através das membranas celulares e liga-se a receptores proteicos específicos (receptores andrógenos); os complexos receptores-testosterona agem como moduladores transcripcionais nas regiões cis-regulatórias de vários genes.

Excesso de andrógeno em mulheres causa hirsutismo e sinais de virilização; o nível de Testosterona no soro deve ser determinado antes e depois de estimulação e supressão ovariana e adrenal para identificar a fonte de produção excessiva de hormônios.

Hipogonadismo primário e secundário em homens resulta em hipoandrogenização clínica, correlacionada com falência gonadal na produção de Testosterona. A determinação da Testosterona no soro juntamente com LH permite a correta avaliação destas condições.

O diagnóstico da verdadeira anorquia deve também discriminar esta condição de criptorquidismo. Sobre prolongada estimulação de hCG, os níveis de Testosterona permanecem muito baixos na anorquia verdadeira, enquanto que nos testes criptorquídios podem responder a estimulação.

Síndromes da resistência andrógena, devido à deficiência ligada ao receptor do gene X, são feitas de várias medidas da ambigüidade sexual. Qualquer que seja a severidade das anormalidades fenotípicas, a Testosterona no soro é sistematicamente alta considerando os níveis no soro de Lh nestas condições.

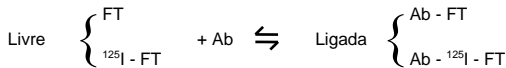
Ensaios de Testosterona incluem testosterona total (direta, extração, tubos revestidos) e determinações de testosterona livre.

Testosterona total no plasma inclui: Testosterona livre e Testosterona ligada a SHBG, albumina, CBG. A percentagem média de cada, em homens normais, é 2,7, 32, 65 e < 0.1 respectivamente.

Solventes quebram ligações proteicas nos ensaios de extração enquanto agentes de bloqueio liberam Testosterona das proteínas em ensaios diretos. A vantagem do ensaio da testosterona livre é que as concentrações de testosterona livre estão em equilíbrio com a testosterona ligada a receptores nos órgãos.

## 2. PRINCÍPIO DO MÉTODO :

A Testosterona livre (TF) CT RIA obedece à lei da ação da massa atuando de acordo com a equação a seguir:



Desde que as concentrações de <sup>125</sup>I - TF e anticorpos adsorvidos são constantes, o estado de progresso da equação depende da concentração de TF. A quantidade de <sup>125</sup>I - TF ligado ao tubo adsorvido é inversamente proporcional à concentração de TF na amostra.

Seguindo a incubação, o tubo é aspirado para remover o excesso de T marcado não ligado.

Concentração das amostras de pacientes são lidas na curva de calibração.

## 3. MATERIAL FORNECIDO E ESTOCAGEM :

Estocado à 2 - 8°C, o material pode ser usado até o prazo de validade impresso em cada etiqueta.

- 3.1. 

--

 2 x 48 Tubos de Polistireno (12 x 75 mm) adsorvidos com anticorpos policlonais anti-Testosterona. Permita que os tubos adsorvidos alcancem a temperatura ambiente antes do uso.
- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 amarelo, 42 ml  
1 frasco de Testosterona Livre marcada com <sup>125</sup>I análoga na proteína. Tampão contendo < 0.1 % NaN<sub>3</sub> como preservativo.  
Cada frasco contém menos que 185 Kbc ( 5 µCi)
- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 0.5 ml em cada tubo - N=0 to 5  
6 tubos de Testosterona Livre em soro humano contendo preservativo (NaN<sub>3</sub>< 0.1 %).  
As concentrações estão marcadas nas etiquetas.  
**(Veja os valores exatos nos rótulos dos frascos)**

- 3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 frascos, liofilizados - N=1 ou 2  
2 tubos de plasma humano contendo preservativo (Timol). Os controles são analisados juntamente com as amostras dos pacientes. As médias para o controles são impressas nas etiquetas dos tubos.  
Antes do uso, reconstitua os conteúdos dos controles com 0.5 ml de água destilada.  
Após a reconstituição, os controles devem ser aliquoteado e eles devem ser mantidos à temperatura de -20 ° C para um máximo de 3 meses.  
**(Veja os valores exatos nos rótulos dos frascos)**

- 3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x concentrado, 10 ml  
1 frasco de solução tampão concentrado contendo azida sodica (NaN<sub>3</sub> < 0.1 %). Coloque a solução em 700 ml de água destilada.  
A solução de lavagem reconstituída é estável durante 2 semanas a 2-8 ° C se for coberta com película adesiva para evitar a contaminação.

## 4. MATERIAL REQUERIDO MAS NÃO FORNECIDO :

- bancada, protegida por papel absorvente para reduzir os efeitos da contaminação pela radioatividade.
- containers para descarte do lixo, apropriadamente marcado e apropriado para materiais radioativos líquidos e sólidos.
- micropipetas manuais ou automáticas para dispensar amostras ou reagentes sem contaminação cruzada.
- papel absorvente.
- bomba de vácuo, para aspiração.
- banho maria
- contador de cintilação gamma
- papel gráfico apropriado para plotar os resultados.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Coleta e manuseio das amostras de sangue :

A amostra de sangue pode ser coletada dentro de um tubo seco. Após separação das células vermelhas, as amostras de soro podem ser analisadas imediatamente, dentro de 24 horas se estocadas à 2 - 8°C, ou mais tarde, após um período superior a alguns meses, se estocadas à -20°C. Deve-se evitar repetidos descongelamentos e congelamentos.

### 5.2. Procedimento do ensaio :

Reagentes estocados à 2°- 8° C. devem ser colocados à temperatura ambiente antes do uso. Não misture reagentes de diferentes lotes. Marque os tubos para T (« ContagemTotal » não use tubos recobertos) calibradores, amostras e controles. Calibradores e controles devem ser misturados antes do uso por inversão ou agitação, mas não por rotação no vortex.

Realize o ensaio em duplicata. Calibradores, controles e amostras devem ser analisados ao mesmo tempo.

Cada tubo pode ser usado apenas uma vez

1. Curva calibradora :  
Pipete 50 µl de cada calibrador dentro dos tubos correspondentes.
2. Amostras e controles :  
Pipete 50 µl de cada amostra ou controle dentro dos tubos correspondentes.
3. Adicione 400 µl de <sup>125</sup>I - TESTOSTERONA marcada análoga para cada tubo. Vortex e cubra.
4. Incube 2 horas à 37 ± 2°C.
5. Cuidadosamente aspire a solução de todos os tubos. (Exceto tubos de contagem total).
6. Adicione 2 ml de solução de lavagem em cada tubo. Aspire cuidadosamente. (Exceto tubos de contagem total).
7. Adicione 2 ml de solução de lavagem em cada tubo. Aspire cuidadosamente. (Exceto tubos de contagem total).
8. Conte a radioatividade fixada em cada tubo por pelo menos 60 segundos

### 5.3. Processando os dados

Determine a contagem média para cada conjunto de tubos em duplicata.

Calcule a proporção B/B0 como a seguir :

$$B/B0 \% = [ \text{Cal ou Smp cpm} / B0 (\text{Cal 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Desenhe a curva calibradora plotando a proporção B/B0 % (escala linear) obtida de cada calibrador versus sua respectiva concentração expressada em pg/ml (escala logarítmica). Concentração de TESTOSTERONA LIVRE nas amostras podem ser lidas diretamente da curva calibradora.

Se o computador é usado para calcular os resultados, os dados devem ser ajustados para equação apropriada : smoothed spline.

### 5.4. Exemplo de um ensaio típico

	Conteúdo (pg/ml)	cpm duplicata	cpm 2nd duplicata	Contagem Média padrão	B/Bo (%)	Testosterona Livre (pg/ml)
Total counts	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 low	1,5 - 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 high	15 - 29	5736	5002	5369	20,8	21
Sample 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Sample 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Sample 3		4681	4645	4663	24,3	33

Exemplo de ensaio típico, não use para cálculos

## 6. PERFORMANCE CARACTERÍSTICAS :

### 6.1. Especificidade

Esteróide	% Reação-cruzada
Testosterona	100
5 $\alpha$ DHT	0.006
andostenediona	0.02
$\beta$ estradiol	0.0003
DHEA-S	0.000001
Androsterona, Corticosterona, 11 DOC, estriol, estrona, progesterona, DHEA	N.D.

### 6.2. Limite de detecção:

O LOB (Limite de Branco) foi calculado medindo o branco várias vezes e foi calculado como a média - 1,65 desvios padrão da distribuição dos melhores valores. O LOB foi calculado como sendo 0,08 pg / ml.

O LOD (limite de detecção) foi calculado como o LOB - 1.645 desvios padrão de uma amostra de baixa concentração testada em 10 execuções diferentes. O LOD foi calculado como sendo 0.40 pg / ml.

### 6.3. Reprodutibilidade :

	Variação dentro do ensaio		Variação entre os ensaios	
	Valor médio (pg/ml)	10 replicatas (% CV)	Valor médio (pg/ml)	7 Ensaios separados em duplicata (% CV)
Pool 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pool 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pool 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

7.1. Os resultados obtidos deste ou de outro kit de diagnóstico devem ser usados e interpretados somente dentro do contexto de um quadro clínico.

7.2. Não use amostras lipêmicas, hemolizadas, ictericas ou turvas.

7.3. Não use amostras de plasma

## 8. VALORES ESPERADOS

É recomendado para cada laboratório estabelecer seus próprios valores de referência.

Grupo idade	Homens			Mulheres		
	número de pessoas	Média pg/ml	Intervalo absoluta pg/ml	número de pessoas	Média pg/ml	Intervalo absoluta pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND - 2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. CUIDADOS E PRECAUÇÕES

### Somente para diagnóstico IN VITRO

#### CUIDADO : Material Radioativo

Este kit contém <sup>125</sup>I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e  $\gamma$  (35.5 keV) ionizantes.

Este produto radioativo pode ser transferido e utilizado apenas por pessoas autorizadas; a aquisição, conservação, uso e troca de produtos radioativos está sujeita a legislação nacional. Em caso algum este produto poderá ser administrado a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação de material radioativo deve ser executada em área própria longe de locais de passagem. Deve ser mantido no laboratório um livro de notas (log book) para a recepção e conservação dos materiais radioativos. O equipamento de laboratório contaminado e as substâncias perigosas devem ser eliminadas e separadas para evitar contaminação por diferentes isótopos.

Quaisquer derrames de material radioativo devem ser imediatamente limpos de acordo com os procedimentos de radiosssegurança. O lixo radioativo deve ser eliminado de acordo com a legislação local e com as diretivas vigentes. A adesão às regras básicas de segurança com material radioativo confere a proteção adequada.

Evitar contacto com a pele, olhos e mucosas (azida sódica como conservante) Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não utilize as pipetas com o auxílio da boca. Use vestuário de proteção e luvas descartáveis.

Para mais informações, consulte Folha de Dados de Segurança do Material (MSDS).

#### CUIDADO : Azida Sódica

Alguns componentes contêm azida sódica como agente preservativo (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Descarte todos os reagentes lavando com grande quantidade de água através de um sistema de bombeamento.

#### CUIDADO: material potencialmente contaminado

Manuseie todos os componentes (e todas as amostras de pacientes) como se fosse capaz de transmitir doenças virais como as hepatites B e C e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

Fontes de materiais derivados de fluidos corporais e órgãos humanos são usados na preparação deste kit foram testados e dando negativos para HBsAg e anti-HCV por imunoenensaio. Entretanto, não é conhecido nenhum teste que garanta que o material não contenha agentes causadores de hepatites virais.

Do mesmo modo, todos os materiais humanos usados na preparação deste kit foram testados para presença de anticorpos contra HIV-1 e -2 por ELISA e foram negativos. Entretanto, a ausência destes anticorpos não garante a ausência do agente viral responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abraham G., Manlins F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santen R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεύθερης τεστοστερόνης σε ανθρώπινο ορό



KIP19000

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. Για επαγγελματική χρήση μόνο

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ:** Για *IN VITRO* προσδιορισμό των επιπέδων της ελεύθερης τεστοστερόνης (FT) σε περιπτώσεις δασυτριχισμού και υπογοναδισμού.

Η ελεύθερη τεστοστερόνη διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και δεσμεύεται σε πρωτεΐνες ειδικών υποδοχέων (υποδοχείς ανδρογόνων). Τα σύμπλοκα τεστοστερόνης-υποδοχέων λειτουργούν ως ρυθμιστές μεταγραφής στις περιοχές ρύθμισης cis πολλών γονιδίων.

Υπερβολική ποσότητα ανδρογόνων στις γυναίκες προκαλεί δασυτριχισμό και σημεία αρρενοποίησης. Το επίπεδο της τεστοστερόνης στον ορό πρέπει να προσδιοριστεί πριν και μετά από τη διέγερση και την καταστολή των ωοθηκών και των επινεφριδίων για να εντοπιστεί η προέλευση της υπερβολικής παραγωγής της ορμόνης.

Ο πρωτοπαθής και δευτεροπαθής υπογοναδισμός στους άνδρες έχει ως συνέπεια την κλινική υποανδρογονόγνεση, η οποία συσχετίζεται με το βαθμό ανεπαρκούς παραγωγής τεστοστερόνης από τις γονάδες. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της τεστοστερόνης στον ορό μαζί με τον προσδιορισμό της LH επιτρέπει τη σωστή αξιολόγηση αυτών των καταστάσεων.

Η διάγνωση πραγματικής ανορχίας απαιτεί επίσης τη διάκριση αυτής της κατάστασης από την κρυφορχία. Υπό συνθήκες παρατεταμένης διέγερσης της hCG, στην πραγματική ανορχία τα επίπεδα της τεστοστερόνης παραμένουν πολύ χαμηλά, ενώ στην περίπτωση της κρυφορχίας οι όρχεις ενδέχεται να ανταποκριθούν στη διέγερση.

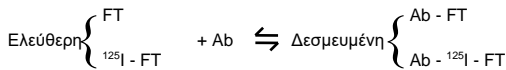
Τα σύνδρομα αντοχής στα ανδρογόνα, τα οποία οφείλονται σε ανεπάρκειες του X συνδεδεμένου γονιδίου υποδοχέων ανδρογόνων, έχουν να κάνουν με διάφορους βαθμούς σεξουαλικού διμορφισμού. Άσχετα από τη σοβαρότητα των φαινοτυπικών ανωμαλιών, σε αυτές τις καταστάσεις τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον ορό είναι συστηματικά υψηλά ως προς τα αυξημένα επίπεδα της LH στον ορό.

Στους προσδιορισμούς τεστοστερόνης περιλαμβάνονται οι προσδιορισμοί ολικής τεστοστερόνης (άμεσοι, με εκχύλιση, με επιστρωμένα σωληνάρια) και ελεύθερης τεστοστερόνης.

Η ολική τεστοστερόνη του πλάσματος περιλαμβάνει ελεύθερη τεστοστερόνη και τεστοστερόνη δεσμευμένη σε SHBG, λευκωματίνη και CBG. Στους φυσιολογικούς άνδρες, το μέσο ποσοστό επί τοις εκατό για κάθε μορφή είναι 2,7, 32, 65 και <0,1 αντίστοιχα.

Στους προσδιορισμούς με εκχύλιση διαλύτες διασπούν τη δέσμευση των πρωτεϊνών, ενώ στους άμεσους προσδιορισμούς ανασταλικοί παράγοντες απελευθερώνουν την τεστοστερόνη από πρωτεΐνες. Το πλεονέκτημα ενός προσδιορισμού ελεύθερης τεστοστερόνης είναι ότι οι συγκεντρώσεις ελεύθερης τεστοστερόνης βρίσκονται σε ισορροπία με την τεστοστερόνη που είναι δεσμευμένη σε υποδοχείς των οργάνων.

**2. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ:** Ο προσδιορισμός ελεύθερης τεστοστερόνης (FT) CT RIA διέπεται από το νόμο δράσης της μάζας σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:



Δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις της σημασμένης με <sup>125</sup>I ελεύθερης τεστοστερόνης και των επιστρωμένων αντισωμάτων είναι σταθερές, η κατάσταση προόδου της εξίσωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της FT. Η ποσότητα της σημασμένης με <sup>125</sup>I ελεύθερης τεστοστερόνης που είναι δεσμευμένη στο επιστρωμένο σωληνάριο είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της FT στο δείγμα.

Μετά από την επίωση, γίνεται αναρρόφηση στο σωληνάριο για να αφαιρεθεί η επιπλέον μη δεσμευμένη σημασμένη τεστοστερόνη.

Η ανάγνωση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων των ασθενών γίνεται από μια καμπύλη βαθμονόμησης.

### 3. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ:

Όταν φυλάσσονται στους 2 - 8 ° C, τα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται σε κάθε ετικέτα.

3.1. 

--

 2 x 48 σωληνάρια από πολυπροπυλένιο (12 x 75 mm), επιστρωμένα με πολυκλωνικά αντισώματα αντι-τεστοστερόνης.

Αφήνετε συστηματικά τα επιστρωμένα σωληνάρια να φθάνουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν τη χρήση.

3.2. 

Ag	125I
----	------

κίτρινο, 42 ml  
1 φιάλη με σημασμένο <sup>125</sup>I ανάλογο Ελεύθερης Τεστοστερόνης σε ρυθμιστικό πρωτεϊνικό διάλυμα, το οποίο περιέχει <0,1 % NaN3 σαν συντηρητικό  
Κάθε φιάλη περιέχει λιγότερο από 185 kBq (5 μCi).

3.3. 

CAL	N
-----	---

0,5 ml σε κάθε φιαλίδιο - N=0 έως 6  
7 φιαλίδια ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ σε ανθρώπινο ορό που περιέχει συντηρητικό (NaN3<0,1 %).  
Οι συγκεντρώσεις αναγράφονται στις ετικέτες.  
**(Δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)**

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

2 φιαλίδια, λυοφιλοποιημένα - N=1 ή 2  
2 φιαλίδια ανθρώπινου πλάσμα που περιέχει συντηρητικό (θυμόλη). Οι έλεγχοι πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό μαζί με τα δείγματα των ασθενών. Τα πεδία τιμών για τους έλεγχοι αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων.

Πριν από τη χρήση, να ανασυσταθούν τα περιεχόμενα των διαλυμάτων ελέγχου με 0.5 ml αποσταγμένου νερού. Μετά την ανασύσταση, οι έλεγχοι θα πρέπει να διαιρείται και θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία -20 ° C για τη μέγιστη 3 μήνες.  
**(Δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)**

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

συμπυκνωμένο 70x, 10 ml  
1 φιαλίδιο (10 ml) ρυθμιστικού διαλύματος με συντηρητικό: NaN<sub>3</sub> (<0,1%). Αραιώστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου με αποσταγμένο νερό μέχρι τα 700 ml (τελικός όγκος).  
Το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 2 εβδομάδες στους 2-8 ° C αν καλύπτεται με συγκολλητική μεμβράνη για να αποφευχθεί μόλυνση.

### 4. ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ:

- Επιφάνειες πάγκου προστατευμένες με απορροφητικό χαρτί για να μειωθούν οι επιπτώσεις από πιπίλισματα ραδιενεργού υλικού.
- Δοχεία απόρριψης αποβλήτων σημασμένα όπως πρέπει και κατάλληλα για στερεά ή υγρά ραδιενεργά υλικά.
- Μη αυτόματες ή αυτοματοποιημένες μικροπιπέτες ακριβείας για τη διανομή των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων χωρίς κίνδυνο επιμόλυνσης.
- Απορροφητικό χαρτί.
- Αντλία κενού συνδεδεμένη μέσω σιφονιού, για αναρρόφηση
- Επωαστήρας στους 37 ° C
- Παλινδρομικής ή τροχιακής κίνησης αναδευτήρας (μέγ. 350 rpm).
- Απαριθμητής σπινθηρισμών γ ακτινοβολίας.
- Χαρτί γραφημάτων κατάλληλο για την αποτύπωση των αποτελεσμάτων.

### 5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ:

#### 5.1. Σύλληψη και χειρισμός των δειγμάτων αίματος:

Το δείγμα αίματος μπορεί να συλλεχθεί σε ένα στεγνό σωληνάριο.

Μετά από διαχωρισμό από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα δείγματα ορού μπορούν να υποβάλλονται σε προσδιορισμό άμεσως, εντός 24 ωρών, αν φυλάσσονται στους 2 - 8 ° C, ή αργότερα, μετά από μια περίοδο έως και αρκετών μηνών, αν φυλάσσονται στους -20 ° C. Πρέπει να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.

#### 5.2. Διαδικασία του προσδιορισμού:

Τα αντιδραστήρια που φυλάσσονται στους 2° - 8° C πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Δεν πρέπει να αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες. Σημάνετε τα σωληνάρια για T («Total» [μετρήσεις του ιχνηθέτη], μη χρησιμοποιείτε επιστρωμένα σωληνάρια), τους βαθμονομητές, τα δείγματα και τους ορούς ελέγχου. Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου πρέπει να αναμειγνύονται πριν από τη χρήση με αναστροφή ή με ανάδευση και όχι με στροβιλισμό.

Εκτελέστε τον προσδιορισμό εις διπλούν. Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου και τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό ταυτόχρονα.

Κάθε σωληνάριον μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά

#### 1. Καμπύλη βαθμονόμησης:

Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε βαθμονομητή στα αντίστοιχα σωληνάρια.

#### 2. Δείγματα και έλεγχοι:

Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε δείγμα ή έλεγχο στα αντίστοιχα σωληνάρια.

3. Προσθέστε 400μl ιχνηθετημένο με <sup>125</sup>I ανάλογο της Τεστοστερόνης σε κάθε σωληνάριο. Ανακινήστε και καλύψτε.

4. Επώαστε επί 2 ώρες στους 37±2°C

5. Αναρροφήστε προσεκτικά το διάλυμα όλων των σωληναρίων. (Εκτός από τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ["total"])

6. Προσθέστε 2 ml από το διάλυμα πλύσης σε κάθε σωληνάριο. Αναρροφήστε προσεκτικά. (Εκτός από τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ["total"])

7. Προσθέστε 2 ml από το διάλυμα πλύσης σε κάθε σωληνάριο. Αναρροφήστε προσεκτικά. (Εκτός από τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ["total"])

8. Μετρήστε τη δεσμευμένη σε κάθε σωληνάριο ραδιενέργεια επί τουλάχιστον 60 δευτερόλεπτα.



### 5.3. Επεξεργασία δεδομένων:

Προσδιορίστε τη μέση τιμή κρούσεων για κάθε σετ διπλών σωληναρίων.  
Υπολογίστε το λόγο Β/Β0 ως ακολούθως:

$B/B0 \% = [ \text{Πρότυπο διάλυμα ή crm δείγματος} / B0 ( \text{Πρότυπο διάλυμα 0} ) \text{ crm}] \times 100$   
Σχεδιάστε την καμπύλη βαθμονόμησης αποτυπώνοντας το λόγο Β/Β0 % (γραμμική κλίμακα) που έχει ληφθεί για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχής του συγκέντρωσης, εκφρασμένης σε pg/ml (λογαριθμική κλίμακα). Οι συγκεντρώσεις ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ σε δείγματα είναι δυνατόν να αναγνωστούν απευθείας από τη καμπύλη βαθμονόμησης.

Αν χρησιμοποιείται ηλεκτρονικός υπολογιστής για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, τα δεδομένα είναι δυνατόν να προσαρμοστούν στην κατάλληλη εξίσωση: ομαλοποιημένη καμπύλη spline.

### 5.4. Παράδειγμα ενός τυπικού προσδιορισμού:

	Περιεχόμενα (pg/ml)	1° crm επανάληψη	2° crm επανάληψη	Μέση τιμή μέτρησης	B/B0 (%)	Ελεύθερη τεστοστερόνη (pg/ml)
Μετρήσεις του ιχνηθέτη ("total")	-	52039	51647	51843	-	-
Πρότυπο διάλυμα 0	0	25839	25961	25900	100	-
Πρότυπο διάλυμα 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Πρότυπο διάλυμα 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Πρότυπο διάλυμα 3	3	12437	12428	12433	48	-
Πρότυπο διάλυμα 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Πρότυπο διάλυμα 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Πρότυπο διάλυμα 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
Βαθμονομητής 1 χαμηλής τιμής	1,5 – 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
Βαθμονομητής 2 υψηλής τιμής	15 – 29	5736	5002	5369	20,8	21
Δείγμα 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Δείγμα 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Δείγμα 3		4681	4645	4663	24,3	33

Παράδειγμα ενός τυπικού προσδιορισμού (να μη χρησιμοποιηθεί για υπολογισμούς)

## 6. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ:

### 6.1. Ειδικότητα

Στεροειδές	% Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
Τεστοστερόνη	100
5α DHT	0,006
Ανδροστενεδιόνη	0,02
β ιστραδιόλη	0,0003
DHEA-S	0.000001
Ανδροστερόνη, κορτικοστερόνη, 11 DOC, ιστριόλη, ιστρόνη, προγεστερόνη, DHEA	Μη ανιχν.

### 6.2. Όριο ανίχνευσης:

Το LOB (Λευκό Όριο) υπολογίστηκε με τη μέτρηση του λευκού αρκετές φορές και αντιστοιχεί στη μέση - 1.65 τυπική απόκλιση της κατανομής αυτών των τιμών. Η LOB υπολογίζεται σε 0.08 pg / ml.

Το LOD (όριο ανίχνευσης) υπολογίστηκε ως η τυπική απόκλιση LOB - 1.65 ενός δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης που δοκιμάστηκε σε 10 διαφορετικές δοκιμασίες. Η LOD υπολογίζεται στα 0.40 pg / ml.

### 6.3. Αναπαραγωγιμότητα:

	Διακύμανση στα πλαίσια του ίδιου προσδιορισμού		Διακύμανση μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών	
	Μέση τιμή (pg/ml)	10 επαναληψιμων (% ΣΔ)	Μέση τιμή (pg/ml)	7 διαφορετικών προσδιορισμών εις διπλούν (% ΣΔ)
Μείγμα 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Μείγμα 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Μείγμα 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ:

7.1. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από το παρόν ή οποιοδήποτε άλλο διαγνωστικό kit θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να ερμηνεύονται μόνο στο πλαίσιο μιας γενικότερης κλινικής εικόνας.

7.2. Μην χρησιμοποιείτε λιπαιμικά, αιμολυμένα, ικτερικά ή θολά δείγματα.

7.3. Μην χρησιμοποιείτε δείγματα πλάσματος.

## 8. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ:

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές του τιμές αναφοράς.

ηλικιακή ομάδα	Άνδρες			Females		
	αριθμός των ανθρώπων	Διάμεσος pg/ml	απόλυτο εύρος pg/ml	αριθμός των ανθρώπων	Διάμεσος pg/ml	απόλυτο εύρος pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND - 2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

### Μόνο για IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ χρήση

#### ΠΡΟΣΟΧΗ: Ραδιενεργό υλικό

Το kit αυτό περιέχει το <sup>125</sup>I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35,5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε μη πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS).

#### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Αζίδιο του νατρίου

Μερικά στοιχεία περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως παράγοντα συντήρησης (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Απορρίψτε τα αντιδραστήρια ξεπλένοντας με άφθονο νερό μέσω του συστήματος της αποχέτευσης.

#### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Δυνητικός μολυσματικό υλικό

Να χειρίζεστε όλα τα στοιχεία (και όλα τα δείγματα των ασθενών) σαν να πρόκειται για ουσίες που δυνητικώς μπορεί να μεταδώσουν ιογενείς νόσους, όπως η ηπατίτιδα Α και Β και το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS).

Το αρχικό υλικό, το οποίο προήλθε από σωματικά υγρά ή όργανα και χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του παρόντος kit έχει ελεγχθεί και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικό ως προς την παρουσία HBsAg και αντι-HCV μέσω ανοσοπροσδιορισμού. Ωστόσο, καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να διασφαλίσει σε απόλυτο βαθμό ότι τέτοιου είδους υλικά δεν περιέχουν τον αιτιολογικό παράγοντα της ιογενούς ηπατίτιδας.

Παρομοίως, όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του παρόντος kit ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του HIV-1 και -2 μέσω ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Ωστόσο, η απουσία του αντισώματος αυτού δεν εγγυάται την απουσία του ιογενούς παράγοντα που ευθύνεται για το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας.

## 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Abraham G., Manlino F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61, 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings E.J. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Oznaczenie radioimmunoenzymatyczne do ilościowego określania poziomu wolnego testosteronu w surowicy ludzkiej

KIPI19000

DO DIAGNOSTYKI IN VITRO. Tylko do użytku profesjonalnego

pl

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. PRZEZNACZENIE:** Do oznaczania poziomów wolnego testosteronu (Free Testosteron (FT)) metodą *in vitro* w diagnostyce hirsutyzmu i hipogonadyzmu.

Wolny testosteron przenika przez błony komórkowe i wiąże się ze swoistymi białkami receptorowymi (receptorami androgenów); Kompleksy testosteron-receptor są modulatorami transkrypcji obszarów cis-regulatorowych wielu genów.

Nadmiar androgenów u kobiet prowadzi do hirsutyzmu i występowania objawów wirylicacji. Aby określić źródło nadmiernego wytwarzania testosteronu, poziom hormonu w surowicy powinien być oznaczany przed i po stymulacji jajników i nadnerczy oraz w testach hamowania.

Hipogonadyzm pierwotny i wtórny u mężczyzn prowadzi do klinicznych objawów hipogonadyzacji, związanych ze stopniem upośledzenia wytwarzania testosteronu przez gonady. Oznaczenie testosteronu w surowicy wraz z poziomem LH umożliwiają właściwą ocenę takich stanów klinicznych.

Diagnostyka anorchii prawdziwej wymaga zróżnicowania tej choroby od wnetrostwa. W anorchii prawdziwej, w warunkach wydłużonej stymulacji hCG poziomy testosteronu pozostają bardzo niskie, podczas gdy jądra pacjenta z wnetrostwem odpowiadają na stymulację.

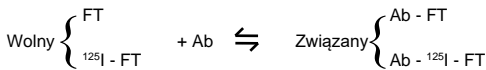
Zespoły oporności na androgeny, wynikające np. z niedoborów genu receptora androgenowego, związanego z chromosomem X, związane są z różnym stopniem obojactwa płciowego. Niezależnie od stopnia ciężkości anomalii fenotypowych, poziom testosteronu w surowicy w takich stanach jest zawsze wysoki ze względu na podwyższone wartości LH w surowicy.

Oznaczenia testosteronu polegają na badaniu testosteronu całkowitego (metoda bezpośrednia, ekstrakcja, próbkiki opłaszczane)

W skład testosteronu całkowitego w osoczu wchodzi wolny testosteron i testosteron związany z SHBG, albuminami i CBG. Rozkład procentowy tych postaci hormonu przedstawia się następująco: (odpowiednio) 2,7, 32, 65 i <0,1%.

Rozpuszczalniki przerywają wiązanie hormonu z białkami w oznaczeniach ekstrakcyjnych, podczas gdy środki blokujące uwalniają testosteron z białek w oznaczeniach bezpośrednich. Zaletą oznaczenia wolnego testosteronu polega na równowadze stężeń wolnego testosteronu z poziomami testosteronu związanego z receptorami w tkankach.

**2. ZAŁOŻENIA METODY:** Oznaczenie wolnego testosteronu (FT) metodą CT RIA polega na zastosowaniu prawa działania mas, zgodnie z następującym równaniem:



Ponieważ stężenia  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  i opłaszczonych przeciwciał są stałe, osiągnięcie równowagi zależy od poziomu FT. Ilość  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  związana w opłaszczonych próbkach jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia FT w próbce.

Po okresie inkubacji, zawartość próbki jest aspirowana w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanego oznakowanego T.

Stężenia substancji w próbce pacjenta odczytywane są za pomocą krzywej kalibracyjnej.

### 3. MATERIAŁY DOSTARCZONE I PRZECHOWYWANIE:

Przechowywany w temperaturze 2-8°C materiał, może być wykorzystywany do daty ważności wydrukowanej na każdej etykiecie.

3.1. 

--

 2 x 48 próbek polistyrenowych (12 x 75 mm) opłaszczonych przeciwciałami poliklonalnymi anty-testosteronowymi. Przed użyciem należy zawsze umożliwić osiągnięcie przez opłaszczoną próbkę temperatury pokojowej (18-25°C).

3.2. 

Ag	125I
----	------

 żółte, 42 ml  
1 butelka analogu WOLNEGO TESTOSTERONU, oznakowanego  ${}^{125}\text{I}$  w buforze opartym na substancji białkowej, zawierającym <0,1 %  $\text{NaN}_3$  jako środek konserwujący.  
Każda butelka zawiera mniejszą dawkę substancji promieniotwórczych niż 185 Kbc (5  $\mu\text{Ci}$ )

3.3. 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml w każdej fiole – N= od 0 do 6  
7 fiolek WOLNEGO TESTOSTERONU w ludzkiej surowicy z zawartością środka konserwującego ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ).  
Stężenia są wydrukowane na etykietach.  
**(Zobacz dokładne wartości na etykietach fiolek)**

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 fiolek materiał liofilizowany – N= 1 lub 2  
2 fiolek ludzkiej osocza z zawartością środka konserwującego (Tymol). Kontrolne powinny być oznaczone razem z próbkami pacjentów. Zakresy dla kontrolne są wydrukowane na etykietach fiolek.  
Przed użyciem, kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 0.5 ml wody destylowanej.  
Po rozpuszczeniu sterujące powinny być dzielone na równe objętości i powinny być przechowywane w temperaturze -20 °C dla maksymalnie 3 miesięcy.  
**(Zobacz dokładne wartości na etykietach fiolek)**

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 roztwór 70 x stężony, 10 ml  
1 butelka stężonego roztworu buforowego, zawierającego azydek sodowy ( $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ ). Nalać roztwór do 700 ml wody destylowanej.  
Przygotowany roztwór myjący zachowuje trwałość przez 2 tygodnie w temperaturze 2-8 ° C, jeśli jest pokryty warstwą klejącą, aby uniknąć zanieczyszczenia.

### 4. MATERIAŁY WYMAGANE LECZ NIE ZAWARTE W ZESTAWIE:

- powierzchnie robocze, zabezpieczone papierem absorcyjnym, w celu ograniczenia ryzyka wycieku płynnych substancji radioaktywnych.
- pojemniki na odpady, odpowiednio oznakowane i przeznaczone do przechowywania stałych lub ciekłych materiałów radioaktywnych.
- mikropipety ręczne lub automatyczne do dozowania próbek lub odczynników, bez możliwości skażenia krzyżowego.
- papier absorcyjny.
- pompa próżniowa podłączona przez syfon do aspiracji.
- łazienka wodna.
- licznik scyntylicyjny promieniowania gamma.
- odpowiedni papier milimetrowy do wykreślenia wyników.

### 5. METODOLOGIA

#### 5.1. Pobieranie i postępowanie z próbkami krwi:

Próbki krwi mogą być pobierane do suchej próbki.  
Po oddzieleniu od elementów morfotycznych, próbki surowicy mogą być oznaczone od razu, w ciągu 24 godzin, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C lub później, w okresie kilku miesięcy, jeżeli są przechowywane w temperaturze -20°C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

#### 5.2. Procedura oznaczenia:

Odczynniki przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C przed zastosowaniem muszą zostać doprowadzone do temperatury pokojowej (18-25°C). Nie wolno mieszać odczynników pochodzących z różnych serii. Należy odpowiednio oznaczyć próbki jako T (« Total Counts ») – próbki do całkowitego zliczania – nie używać do tego próbek opłaszczonych) oraz próbki kalibratorów, próbek i kontroli. Kalibratory i kontrole powinny być wymieszane przed zastosowaniem bardziej poprzez odwracanie lub obracanie, niż przez wirowanie.

Oznaczenie należy wykonywać podwójnie. Kalibratory, kontrole i próbki muszą być oznaczone w tym samym czasie.

Każda rura może być użyta tylko raz

1. **Krzywa kalibracyjna:**  
Pipetować po 50  $\mu\text{l}$  każdego kalibratora do odpowiednich próbek.
2. **Próbki i kontrole:**  
Pipetować po 50  $\mu\text{l}$  każdej próbki lub kontrolnej do odpowiednich próbek.
3. Dodać 400  $\mu\text{l}$  znacznika analogu  ${}^{125}\text{I}$  – TESTOSTERONU do każdej próbki. Wirować i przykryć.
4. Inkubować przez dwie godziny w temperaturze  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
5. **Dokładnie** aspirować roztwory wszystkie próbki. (Z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
6. Dodać 2 ml roztworu płuczającego do każdej próbki. Dokładnie aspirować zawartość. (Z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
7. Dodać 2 ml roztworu płuczającego do każdej próbki. Dokładnie aspirować zawartość. (Z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
8. Zliczać poziom radioaktywności dla każdej próbki przez co najmniej 60 sekund.

#### 5.3. Przetwarzanie danych:

Określić średnią prędkość zliczania dla każdego zestawu podwójnych próbek. Obliczyć stosunek B/B0, jak przedstawiono poniżej:

$$B/B0 \% = \left[ \frac{\text{liczba zliczeń na minutę (cpm) kalibratora lub próbki}}{B0 (\text{Kal } 0) \text{ cpm}} \right] \times 100$$

Wykreślić krzywą kalibracyjną, wykreślając stosunek B/B0 % (skala liniowa) uzyskany dla każdego kalibratora, w odniesieniu do ich odpowiednich stężeń, wyrażonych w pg/ml (skala logarytmiczna). Stężenia WOLNEGO TESTOSTERONU w próbkach mogą być odczytane bezpośrednio z krzywej kalibracyjnej.

Jeżeli do obliczania wyników wykorzystywany jest komputer, dane mogą być dopasowane do właściwego równania : wyglądzona krzywa składana.

#### 5.4. Przykład typowych oznaczeń:

	Zawartość (pg/ml)	cpm pierwsza duplikacja	cpm druga duplikacja	Średnia prędkość zliczania	B/Bo (%)	Wolny testosteron (pg/ml)
Liczba zliczeń całkowitych	-	52039	51647	51843	-	-
Kal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Kal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Kal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Kal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Kal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Kal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Kal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 poziom niski	1,5 – 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 poziom wysoki	15 – 29	5736	5002	5369	20,8	21
Próbka 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Próbka 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Próbka 3		4681	4645	4663	24,3	33

Przykład typowego oznaczenia (nie powinien być wykorzystywany do obliczeń)

## 6. CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA:

### 6.1. Swoistość

Steryd	% reaktywności krzyżowej
Testosteron	100
5 $\alpha$ DHT	0,006
androstenedion	0,02
$\beta$ estradiol	0,0003
DHEA-S	0,000001
Androsteron, kortykosteron, 11 DOC, estriol, estron, progesteron, DHEA	nie wykryto

### 6.2. Granica wykrywania:

LOB (Limit pustego) obliczono mierząc półfabrykat kilka razy i obliczono jako średnią - 1,65 odchylenia standardowego rozkładu najlepszych wartości. Obliczono, że LOB wynosi 0.08 pg / ml.

LOD (granica wykrywalności) została obliczona jako odchylenie standardowe LOB - 1,645 dla próbki o niskim stężeniu testowanej w 10 różnych seriach. Obliczono LOD na 0.40 pg / ml.

### 6.3. Odtwarzalność:

	Zmienność w serii		Zmienność pomiędzy seriami	
	Wartość średnia (pg/ml)	10 powtórnich oznaczeń (% CV)	Wartość średnia (pg/ml)	7 oddzielnych oznaczeń w oznaczeniach podwójnych (% CV)
Pula 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pula 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pula 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. OGRANICZENIA PROCEDURY

7.1. Wyniki uzyskane na podstawie tego lub innych zestawów diagnostycznych, powinny być stosowane i interpretowane w kontekście całkowitego obrazu klinicznego.

7.2. Nie wolno wykorzystywać próbek lipemicznych, shemolizowanych, żółtaczkowych lub mętnych.

7.3. Nie wolno wykorzystywać próbek osocza.

## 8. OCZEKIWANE WARTOŚCI

Zaleca się, aby każde laboratorium opracowało własne zakresy referencyjne.

Grupa wiekowa	Mężczyźni			Kobiety		
	Liczba ludzi	Mediana stężenie pg/ml	Zakres absolutna pg/ml	Liczba ludzi	Mediana stężenie pg/ml	Zakres absolutna pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND - 2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

### Przeznaczone wyłącznie do diagnostyki in vitro.

#### UWAGA: Materiał radioaktywny

W Zestaw zawiera <sup>125</sup>I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i  $\gamma$  (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

Aby uzyskać więcej informacji, zobacz Arkusz danych dotyczących bezpieczeństwa materiału (MSDS).

#### OSTRZEŻENIE: Azydek sodu

Niektóre składniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Odczynnik należy utylizować, wylewając je do kanalizacji i splukując dużą ilością wody.

#### OSTRZEŻENIE: Materiał potencjalnie zakaźny

Wszystkie składniki (i wszystkie próbki pacjentów) należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, mogący zawierać wirusy zapalenia wątroby B i C lub nabytego zespołu upośledzenia odporności (AIDS).

Materiał źródłowy, pochodzący z płynów uzyskiwanych z ciała ludzkiego lub tkanek, wykorzystywany w przygotowaniu tego zestawu, był przebadany metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki testów na obecność HBsAg i przeciwciał anti-HCV były ujemne. Jednak żadna metoda nie może zagwarantować, że taki materiał nie zawiera wirusów zapalenia wątroby.

W podobny sposób, wszystkie materiały wykorzystywane do przygotowywania tego zestawu były badane przesiewowo pod kątem obecności wirusów HIV-1 i -2 metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki tych badań były ujemne. Jednak brak przeciwciał przeciwko tym wirusom nie może zagwarantować nieobecności wirusów odpowiadających za występowanie zespołu nabytego upośledzenia odporności.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abraham G., Manlinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santner RJ. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wicks EJ. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Radioimmun vizsgálat emberi vérsavó szabad tesztoszteron-tartalmának mennyiségi meghatározására  
KIP19000

hu

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI FELHASZNÁLÁSRA. Csak professzionális használatra

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. A VIZSGÁLAT CÉLJA:

A szabad tesztoszteron (FT, free testosterone) mennyiségének *in vitro* meghatározása hirsutismus és hypogonadismus esetén.

A szabad tesztoszteron átfundál a sejtek membránján és specifikus receptor-fehérjékhez (androgén receptorok) kötődik; a kialakult tesztoszteron-receptor komplexek számos gén cisz-regulációs régiójában kifejtik hatásukat: transzkripció szabályozóanyagként működnek.

Nőkben az androgén-többlet hirsutismushoz és virilizációhoz vezet. A tesztoszteron szintjét a petefészkek és a mellékvesék stimulációja és szuppressziója előtt és után is meg kell határozni, hogy azonosítható legyen a túlzott hormontermelés forrása.

Az elsődleges és másodlagos hypogonadismus férfiakban csökkent androgenizációval jár, aminek súlyossága attól függ, milyen mértékű a nemi szervek tesztoszteron-termelésének alulműködése. A vérsavó tesztoszteron és LH szintjének együttes meghatározása lehetővé teszi az elváltozás mértékének helyes becslését.

A valódi anorchia diagnózisának felállításához szükség van a betegség elkülönítésére a rejtett heréjűségtől. Valódi anorchia esetén a tesztoszteron-koncentráció hosszas hCG stimuláció után is nagyon alacsony marad, míg a cryptorchid herék reagálnak a kezelésre.

Az androgén rezisztencia szindrómák X-kromoszómához kötötten öröklődnek, és az androgén receptorok genetikai hibája váltja ki őket. Ezek során eltérő mértékű interszexualitás alakulhat ki. Azonban bármilyen súlyos is a fenotipusos eltérés, ezekben az esetekben a vérben a tesztoszteron szintje az emelkedett LH-koncentráció hatására magas szokott lenni.

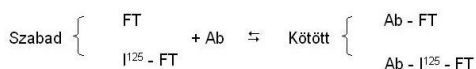
A tesztoszteron-vizsgálatok a teljes (közvetlen, extrakciós, illetve ellenanyaggal borított csöveket alkalmazó eljárások) vagy a szabad tesztoszteron mennyiségét határozzák meg.

A plazmában található teljes tesztoszteron a szabad, valamint az SHBG-hez (sex hormone-binding globulin, nemi hormon kötő globulin), albuminhoz és CBG-hez (corticosteroid binding globulin, kortikoszteroid-kötő globulin) kötött tesztoszteronból áll. Egészséges férfiakban ezek átlagos százalékos értékei 2,7, 32, 65 és <0,1.

Az extrakciós vizsgálatok során használt oldószerek felbontják ezt a kötést, a közvetlen eljárások esetében pedig a blokkoló reagensek szabadítják fel a tesztoszteront a fehérjéről. A szabad tesztoszteron meghatározására szolgáló módszerek azt használják ki, hogy a szabad és a receptorokhoz kötött tesztoszteron koncentrációja a szövetekben egyensúlyban van egymással.

## 2. A VIZSGÁLAT ELVE:

A szabad tesztoszteron (FT) CT RIA során a tömeghatás törvénye érvényesül a következő egyenlet alapján:



Mivel a jódizotóppal jelölt ( $^{125}\text{I} - \text{FT}$ ) és a felszínhez rögzített ellenanyagok (Ab) koncentrációja állandó, az egyensúly jobbra tolódása a csak szabad tesztoszteron koncentrációjától függ. Az ellenanyaggal borított csövek falához kötődött  $^{125}\text{I} - \text{FT}$  mennyisége fordítottan arányos a minta szabad tesztoszteron-koncentrációjával.

Az inkubáció után a csövek tartalmát le kell szívni, hogy eltávolozzon a nem kötődött jelölt tesztoszteron. A minták tesztoszteron-koncentrációja a kalibrációs görbéről olvasható le.

## 3. REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK:

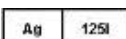
2 - 8°C-on tárolva a reagensek a címkéjükön feltüntetett lejárati idejükig eltarthatók.

3.1.



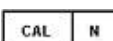
2 x 48 poliszitirén cső (12 x 75 mm), poliklonális anti-tesztoszteron ellenanyagokkal borítva. Használat előtt várja meg, amíg a csövek szobahőmérsékletűre (18-25°C) melegednek.

3.2.



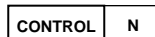
sárga, 42 ml  
1 flakon  $^{125}\text{I}$ -dal jelölt szabad tesztoszteron analóg fehérje alapú pufferben, ami tartósítószerként < 0,1 %  $\text{NaN}_3$ -ot tartalmaz. Flakonként < 185 Kbpq (5  $\mu\text{Ci}$ ).

3.3.



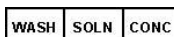
0,5 ml ampullánként - N=0 - 6  
7 ampulla szabad tesztoszteron emberi vérsavóban, tartósítószerrel tartalmaz ( $\text{NaN}_3$  < 0,1%).  
A koncentrációkat lásd a címkéken.  
(Lásd a pontos értékeket az injekciós üveg címkéjén)

3.4.



2 ampulla liofilizált - N=1 vagy 2  
2 ampulla tartósítószerrel (Timol) tartalmazó emberi vérplazma. A kontrollok a betegek mintáival együtt kell megvizsgálni. A kontrollok elfogadható tartományait lásd a címkéken.  
Használat előtt, oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.  
A feloldás után az ellenőrzéseket kell osztjuk és azokat meg kell tartani a -20°C on maximum 3 hónapig.  
(Lásd a pontos értékeket az injekciós üveg címkéjén)

3.5.



70 x koncentrát, 10 ml  
1 flakon tömény puffer, nátrium-azidot tartalmaz ( $\text{NaN}_3$  < 0,1%). Öntse az oldatot 700 ml desztillált vízhez. A feloldott mosóoldat 2 héten át 2-8 °C-on stabil, ha ragasztott fóliával borítja a szennyeződés elkerülése érdekében.

## 4. A VIZSGÁLATHOZ SZÜKSÉGES TOVÁBBI ESZKÖZÖK:

- Nedvszívó papírral borított munkafelületek, a káros hatások csökkentésére radioaktív anyagok kiömlése esetén.
- Folyékony és szilárd radioaktív anyagok gyűjtésére alkalmas kidobóedények, megfelelően feliratozva.
- Kézi vagy automata precíziós mikropipetták a minták és reagensek keresztszennyeződés-mentes béréséhez.
- Nedvszívó papír.
- Szűrővel ellátott vízlégszivattyú a felülűző eltávolításához.
- Vízfürdő.
- Gamma-sugármérő
- Megfelelő milliméterpapír az eredmények ábrázolására.

## 5. A MÓDSZER

### 5.1. Vérminták levétele és tárolása :

A vérmintát natív csőbe kell levenni.

A vörösvérsejtektől történt elválasztás után a savó vizsgálata akár azonnal is elvégezhető, vagy a levételt követően 24 órán belül, ha a mintát a 2-8°C-on tárolja. A vizsgálatot hónapokkal később is elvégezheti, ez esetben a savót fagyassza le -20°C-ra. Kerülje a minta többszöri lefagyasztását és felolvasztását.

### 5.2. A vizsgálat menete :

Használat előtt várja meg, amíg a 2-8°C-on tárolt reagensek felmelegednek szobahőmérsékletűre (18-25°C). Ne keverje az eltérő gyártási számú reagenseket. Feliratozozzon csöveket a teljes radioaktivitás mérésére (T, mint „totál”, ezekhez ne ellenanyaggal borított csöveket használjon), valamint a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A kalibrátorokat és kontrollokat használat előtt keverje meg, de ne vortexeléssel, hanem a csövek forgatásával, illetve körkörös mozgásával.

Mindig két párhuzamos vizsgálatot végezzen. A kalibrátorokat, kontrollokat és mintákat egyidejűleg kell vizsgálni.

#### 1. Kalibrációs görbe :

Mérjen 50  $\mu\text{l}$ -t minden kalibrátorból a megfelelő csövekbe.

#### 2. Minták és kontrollok:

Mérjen 50  $\mu\text{l}$ -t minden mintából és kontrollból a megfelelő csövekbe.

#### 3. Pipettázzon 400 $\mu\text{l}$ $^{125}\text{I}$ - tesztoszteron analóg traceret minden csőbe.

Vortexelje és fedje be a csöveket.

#### 4. Inkubálja őket 2 órán át 37 $\pm$ 2°C-on.

#### 5. Óvatosan szívja öntse le a folyadékot a csövekből. (A totálokat kivéve). (A totálokat kivéve).

#### 6. Mérjen 2 ml mosóoldatot minden csőbe. Óvatosan szívja öntse le a folyadékot a csövekből. (A totálokat kivéve).

#### 7. Mérjen 2 ml mosóoldatot minden csőbe. Óvatosan szívja öntse le a folyadékot a csövekből. (A totálokat kivéve).

#### 8. Mérje a radioaktivitást minden csőben legalább 60 másodpercen keresztül.

### 5.3. Eredmények értékelése :

Határozza meg a párhuzamos mérések átlagos radioaktivitás értékét. Számítsa ki a B/Bo értékeket a következők szerint:

$$B/Bo \% = [ \text{Kalibrátor vagy minta cpm} / B0 \text{ (Kalibrátor 0) cpm} ] \times 100$$

Rajzolja fel a kalibrációs görbét féllogaritmusos grafikonon úgy, hogy a kalibrátorok B/Bo % értékeit a lineáris, a hozzájuk tartozó koncentrációkat (pg/ml) pedig a logaritmusos skálán ábrázolja. A minták szabad tesztoszteron-koncentrációi közvetlenül leolvashatók a kalibrációs görbéről. Ha az eredményeket számítógép segítségével értékeli, a mért adatok behelyettesíthetők a megfelelő egyenletbe: simított spline.

### 5.4. Példa jellemző vizsgálati eredményekre:

	Koncentráció (pg/ml)	cpm 1. mérés	cpm 2. mérés	Átlag cpm	B/Bo (%)	Szabad Tesztoszteron (pg/ml)
Totál	-	52039	51647	51843	-	-
Kal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Kal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Kal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Kal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Kal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Kal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Kal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C1 alacsony	1,5 – 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C2 magas	15 – 29	5736	5002	5369	20,8	21
Minta 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Minta 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Minta 3		4681	4645	4663	24,3	33

Ezek az adatok csak példaként szolgálnak, ne használja őket számításaihoz

## 6. MINŐSÉGI JELLEMZŐK:

### 6.1. Specifititás:

Szteroid	% Keresztreaktivitás
Tesztoszteron	100
5αDHT	0,006
Andosztenedion	0,02
B-ösztadiol	0,0003
DHEA-S	0,000001
Androszteron, kortikoszteron, 11-DOC, ösztriol, ösztion, progeszteron, DHEA	N.D.

### 6.2. Érzékenységi határérték:

Az LOB-ot (üres határérték) úgy számítottuk ki, hogy a vakot többször megmérjük, és az átlag - 1,65 szórásaként számítottuk ki. A LOB-t 0,08 pg / ml értékre számítottuk.

Az LOD-t (detektálási határértéket) a 10 fázisban vizsgált alacsony koncentrációjú mintában LOB-1,65 szórásaként számítottuk ki. Az LOD 0,40 pg / ml-re számított. 6.3. Reprodukálhatóság:

	Vizsgálaton belüli variáció		Vizsgálatok közötti variáció	
	Átlag (pg/ml)	10 párhuzamos (% CV)	Átlag (pg/ml)	7 független vizsgálat, 2-2 párhuzamos (% CV)
Pool 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Pool 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Pool 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

7.1. Az ezzel, vagy bármely más diagnosztikus célú reagenskészlettel kapott adatok csak a beteg más klinikai eredményeit is figyelembe véve értelmezhetők és használhatók fel.

7.2. Ne használjon lipaemiás, haemolizált, icterusos, vagy zavaros mintákat.

7.3. Ne használjon plazma mintákat.

## 8. VÁRT ÉRTÉKEK

Ajánlott minden laboratóriumnak meghatározni saját referencia-tartományát.

Korcsoport	Férfiak			Nők		
	emberek száma	Medián pg/ml	Abszolút tartomány pg/ml	emberek száma	Medián pg/ml	Abszolút tartomány pg/ml
<15	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59	97	11,8	3,6-25,7	77	1,5	ND- 4,0
>60	87	9,7	1,5-28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. MUNKAVÉDELMI SZABÁLYOK

### Csak IN VITRO DIAGNOSZTIKAI felhasználásra

#### FIGYELEM: Radioaktív anyag

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó 125I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagens alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztaszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

További információért lásd az anyagbiztonsági adatlapot (MSDS).

#### VIGYÁZAT: Nátrium-azid

A készlet egyes reagensei nátrium-azidot tartalmaznak tartósítószerként (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Ezeket a reageneket a csapba nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki.

#### VIGYÁZAT: Potenciálisan fertőzésveszélyes anyagok

Kezeljen minden reagenst (és betegmintát) potenciálisan hepatitis B, hepatitis C, illetve HIV vírussal fertőzöttként.

A reagenskészlet előállításához használt emberi testfolyadékokból és szövetekből nyert anyagokat szerológiai módszerrel megvizsgálták, és negatívnak találták HbsAg-re, és anti-HCV ellenanyagokra. Azonban egyetlen ismert vizsgálat alapján sem állítható teljesen biztosan, hogy az ezek az anyagok nem tartalmazhatnak virális hepatitis okozó kórokozókat.

A reagenskészlet előállításához használt emberi eredetű anyagokat szerológiai eljárással HIV-1 és 2 ellen termelt ellenanyagokra is megvizsgálták, és negatívnak találták. Ezen ellenanyagok hiánya azonban nem zárja ki az AIDS kórokozójának jelenlétét.

## 10. IRODALOM

- Abraham G., Manlinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17 , 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santen RJ. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings EJ. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981

# DIAsource Free Testosterone RIA-CT [체외진단의료기기]

바로 읽을 수 있다.

④ 컴퓨터 프로그램으로 결과를 산출하는 경우에는 smoothed spline을 권장한다.

(2) 참고치

나이	남성			여성		
	대상자 수	중간값	범위 (pg/ml)	대상자 수	중간값	범위 (pg/ml)
< 15	49	0.3	ND - 1.8	45	0.3	ND - 2.7
15 - 39	154	13.3	5.4 - 40.0	145	2.3	ND - 4.6
40 - 59	97	11.8	3.6 - 25.7	77	1.5	ND - 4.0
> 60	87	9.7	1.5 - 28.8	92	1.4	ND - 5.0

5. 표준 데이터

다음 자료는 예시일 뿐, 실제 표준곡선을 대신하여 사용해서는 안 된다.

구분	농도 (pg/ml)	cpm 1 중복	cpm 2 중복	Mean cpm	B/B <sub>0</sub> (%)	Free Testosterone (pg/ml)
Total counts	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	
Cal 1	0.3	21086	21170	21128	81.6	
Cal 2	1	16509	16203	16356	63.2	
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	
Cal 4	10	8317	7916	8117	31.3	
Cal 5	30	5017	4711	4864	18.8	
Cal 6	90	2611	2528	2570	9.9	
C1 low	1.5 - 2.9	13461	13557	13508	52.2	2.3
C2 high	15 - 29	5736	5002	5369	20.8	21
Sample 1		17478	16742	16975	65.5	0.86
Sample 2		7538	7423	7481	28.9	11.5
Sample 3		4681	4645	4663	24.3	33

## I. 제품개요

번호	항목	내용
1	품목명	혈중임신·출산호르몬및단백질검사시약
2	제품명	DIAsource Free Testosterone RIA
3	허가번호	체외수인 15-278 호
4	사용목적	사람의 혈청 내 프리 테스토스테론 정량측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8°C, 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8°C, 제조일로부터 70일

## II. 측정원리

<sup>125</sup>I 표지-Free testosterone 농도와 코팅된 항체가 일정하면 FT 농도에 따라 평형이 유지된다. 코팅된 시험관에 결합한 <sup>125</sup>I 표지-Free testosterone 양은 검체의 FT 농도에 반비례한다. 배양 후, 시험관은 결합되지 않은 트래이서를 흡입해 제거한다. 환자 검체의 농도는 표준곡선에 의해 결정된다

## III. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	재구성
1	Coated tube	2 X 48	사용 전 실온(18-25°C)에 이르도록 한다.
2	Tracer ( <sup>125</sup> I labelled free Testosterone)	1 vial, 42ml	즉시 사용 가능
3	Calibrators 0-6	7 vials, 0.5ml/vial	즉시 사용 가능하며 농도는 각 vial label에 표기
4	Control I, II	2 vials, 동결건조	사용 전 증류수 0.5ml 첨가
5	Wash Solution Concentration	1 vial, 10ml	사용 전 증류수로 70배 희석. 10ml 세척용액을 증류수 700ml에 첨가하여 희석

## IV. 측정방법

### 1. 검체 준비

- 혈청으로 검사하며 2-8°C에 보관한다. (혈장으로 검사 불가)
- 측정이 24시간 이내에 이루어지지 않는다면 검체는 -20°C에 냉동 보관해야 한다.
- 반복적인 냉동/해동은 피한다.

### 2. 시약 조제

- 정도관리 용액: 0.5ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- 세척용액: 증류수로 70배 희석한다. 균질화하기 위해 자력교반기를 이용한다.

### 3. 검사 방법 (\*자동화 장비 : GammaPro)

- 각 calibrator, control, 및 검체를 위해 코팅된 시험관 2개씩 준비하여 라벨을 부착한다. Total count를 위해 2개의 일반 시험관을 준비하여 라벨을 부착한다.
- 해당 시험관에 calibrator 50ul씩 분주한다.
- 해당 시험관에 검체와 control 50ul씩 분주한다
- 모든 시험관에 tracer 400ul를 첨가한다. Vortex 후 덮개를 씌운다.
- 2시간동안 37°C ± 2°C에 반응시킨다.
- Total count 제외한 모든 시험관의 내용물을 흡입하여 제거한다.
- Total count 제외한 모든 시험관에 희석된 세척용액 2ml 첨가한 후 조심스럽게 액체를 흡입하여 제거한다.
- (7)번을 반복한다.
- 60초 동안 Gamma Counter로 cpm을 측정한다.

### 4. 결과산출

#### (1) 자료정리

- 두 번 측정된 값의 평균값을 구한다.
- 아래의 공식을 이용하여 결합된 방사능을 계산한다.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Calibrator 또는 검체 cpm}}{B_0 (\text{Calibrator 0}) \text{ cpm}} \times 100$$

- 각 calibrator에 대한 B/B<sub>0</sub> (%) 값(linear scale)을 단위가 pg/ml인 Free Testosterone 농도(logarithmic scale)의 함수로 표시하여 표준곡선을 그린다. 검체의 Free Testosterone 농도는 표준곡선에서

## V. 완제품 시험규격

### 1. 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

- 문서번호 ITPK000에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
- 제품 구성품의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
- 구성품과 키트의 유효기간을 확인
- 구성품의 라벨상태 및 포장상태(용량, 물질 등)를 확인
- 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
- 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
- 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

### 2. 성능시험

제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- 총 계수는 허용범위 (50,000-70,000 cpm) 내에 있어야 한다
- 표준용액 0의 결합률은 허용범위 내에 있어야 한다(38.0-52.0%)
- 표준용액 1의 결합률은 허용범위 내에 있어야 한다 (80-90%)
- 표준용액 5의 결합률은 허용범위 내에 있어야 한다 (7.0-13.0%)
- 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다  
control I 1.75-3.25 pg/ml  
control II 10.5-19.5 pg/ml
- 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다  
Calibrator 1 : 0.21-0.36 pg/ml  
Calibrator 2 : 0.7-1.3 pg/ml  
Calibrator 3 : 2.1-3.9 pg/ml  
Calibrator 4 : 7.0-13 pg/ml  
Calibrator 5 : 21-39 pg/ml  
Calibrator 6 : 63-117 pg/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서 (문서번호 CACQKIPI19000)에 기록되어 있다.

(허용범위는 평균값의 ±3SD를 기준으로 측정된다)

## VI. 사용시 주의사항

- 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.
- 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
  - 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
  - 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
  - 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.

## **DIAsource Free Testosterone RIA-CT [체외진단의료기기]**

- (4) 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
- (5) 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
3. 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
4. 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
5. 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다. 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.
6. 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화합물로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
7. 방사성물질의 취급과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
8. 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.



# Free TESTOSTERONE-RIA-CT

Rádioimunoanalýza pre kvantitatívne stanovenie voľného testosterónu v humánnom sére

KIPI19000

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO. Len na profesionálne použitie

sk

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgicko - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 91

## 1. ZAMÝŠĽANÉ POUŽITIE:

Na stanovenie hladín voľného testosterónu (FT) pri nadmernom ochlpení a hypogonadizme **IN VITRO**.  
Voľný testosterón sa ryztyfkuje cez bunkové membrány a viaže sa na špecifické receptorové bielkoviny (androgénové receptory); Komplexy testosterónových receptorov pôsobia ako modulátory transkripcie na cis-regulačné regióny mnohých génov.

Nadbytok androgénov u žien spôsobuje nadmerné ochlpenie a mužské znaky; hladina testosterónu v sére sa musí stanoviť pred a po stimulácii a potlačení vaječníc a nadobličiek s cieľom identifikovať zdroj nadmernej tvorby hormónu.

Primárny a sekundárny hypogonadizmus u mužov má za následok klinickú hypoandrogenizáciu, súvisiacu s mierou zlyhania gonád v tvorbe testosterónu. Stanovenie séra testosterónu spolu s LH umožňuje správne posúdenie týchto stavov.

Diagnóza skutočnej anorchie zároveň vyžaduje rozlíšenie tohto stavu od kryptorchidizmu. Počas predĺženej stimulácie hCG zostáva pri skutočnej anorchii hladina testosterónu veľmi nízka, pričom kryptorchidové testy môžu na stimuláciu reagovať.

Syndróm rezistencie na androgény pozostáva z dôvodu porúch génu androgénneho receptoru s prepojením na X z rôznych stupňov pohlavnej nejednoznačnosti. Odhliadnuc od závažnosti fenotypových anomálií je sérový testosterón systematicky vysoký, pokiaľ ide od zvýšené sérovej hladiny LH pri týchto stavoch.

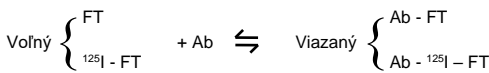
Rozbory testosterónu zahŕňajú stanovenia celkového testosterónu (priamy, extrakciu, potreť skúmvky) a voľného testosterónu.

Celkový testosterón v plazme zahŕňa voľný testosterón a testosterón viazaný na SHBG, albumín, CBG. Priemerný percentuálny podiel každého u normálnych mužov je 2,7, 32, 65 a <0,1.

Rozpúšťadlá narušujú väzbu proteínov v extrakčných súpravách. Výhodou rozboru voľného testosterónu je, že jeho koncentrácie sú v rovnováhe s testosterónom viazaným na receptory v orgánoch.

## 2. PRINCÍP METÓDY:

Voľný testosterón (FT) CT RIA sa riadi zákonom zachovania hmotnosti podľa tejto rovnice:



Keďže koncentrácie  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  a viazané protilátky sú konštantné, vývoj rovnice závisí od koncentrácie FT. Množstvo  ${}^{125}\text{I} - \text{FT}$  viazaného na viazanú skúmvku je inverzne proporcionálne ku koncentrácii FT vo vzorke.

Po inkubácii sa saobsah skúmvky odsaje, aby sa odstránil nadbytočný neviazaný testosterón, označené písmenom T.

Koncentrácie vzorky pacienta sa odčítajú z kalibračnej krivky.

## 3. DODÁVANÝ MATERIÁL A SKLADOVANIE:

Pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C sa materiál môže použiť až do uplynutia dátumu expirácie vytláčeného na každom štítku.

3.1. 

--

 2 x 48 Polystyrénové skúmvky (12 x 75 mm) značené anti testosterónovými polyklonálnymi protilátkami.  
Pred použitím nechajte skúmvky postupne zahriať na izbovú teplotu (18 – 25 °C).

3.2. 

Ag	125I
----	------

 žltá, 42 ml  
1 fľaštička analógu VOĽNÉHO TESTOSTERÓNU s označením 125I in v pufrí na báze proteínu s < 0,1 % Na<sub>3</sub> ako konzervačnou látkou.  
Každá fľaštička obsahuje menej ako 185 Kbc (5 μCi)

3.3. 

CAL	N
-----	---

 0,5 ml v každej ampulke - N=0 až 6  
7 ampuliek VOĽNÉHO TESTOSTERÓNU v humánnom sére s konzervačnou látkou (Na<sub>3</sub><0,1 %).  
Koncentrácie sa uvádzajú na štítkoch.  
(Pozri presné hodnoty na štítkoch ampuliek)

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 ampulky, lyofilizované - N=1 alebo 2  
2 ampulky humánnej plazmy s konzervačnou látkou (tymol).  
Rozbor kontrolných vzoriek sa musí vykonať spolu so vzorkami pacienta. Rozsahy pre kontrolné vzorky sa uvádzajú na štítkoch ampuliek.  
Pred použitím obnovte obsah kontrolných vzoriek s 0,5 ml destilovanej vody. Po obnovení sa kontrolné vzorky musia rozdeliť na alikvotné podiely a môžu uskladniť pri teplote – 20 °C najviac na 3 mesiace.  
(Pozri presné hodnoty na štítkoch ampuliek)

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x koncentrovaný, 10 ml  
1 fľaštička koncentrovaného pufru s obsahom azidu sodného (NaN<sub>3</sub> < 0,1 %). Nalejte roztok do 700 ml destilovanej vody.  
Rekonštituovaný premývavý roztok je stabilný počas 2 týždňov pri teplote 2–8 °C, ak sa prekryje adhezívnou fóliou pre zabránenie kontaminácii.

## 4. POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE DODÁVANÝ:

- pracovné povrchy chránené savým papierom s cieľom znížiť účinky rádioaktívneho úniku;
- správne označené nádoby na zneškodňovanie odpadu a vhodné na tuhé alebo kvapalné rádioaktívne materiály;
- manuálne alebo automatizované presné mikropipety na dávkovanie vzoriek alebo čindiel bez križovej kontaminácie;
- savý papier;
- vákuové čerpadlo pripojené cez aspiračný lapač;
- vodný kúpeľ;
- scintilačný spektrometer žiarenia gama;
- vhodný grafický papier na zapracovanie výsledkov.

## 5. METODIKA

### 5.1. Zber a spracovanie krvných vzoriek:

Krvná vzorka sa môže odobrať do suchej skúmvky.

Po oddelení od červených krviniek sa rozbor vzoriek séra môže vykonať ihneď, do 24 hodín v prípade uskladnenia pri teplote 2 – 8 °C alebo neskôr, aj po niekoľkých mesiacoch, v prípade uskladnenia pri teplote -20 °C. Nesmie dochádzať k opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

### 5.2. Postup rozboru:

Čindlá skladované pri teplote 2°– 8 °C sa musia pred použitím zahriať na izbovú teplotu (18 – 25 °C). Nemiešajte čindlá rôznych šarží. Označte štítkami skúmvky pre kalibrátory T („celkové počty“, nepoužívajte potreť skúmvky), vzorky a kontrolné vzorky. Kalibrátory a kontrolné vzorky sa pred použitím musia premiešať obrátením alebo krúžením namiesto odstredovania.

Rozbor vykonajte duplicitne. Rozbor kalibrátorov, kontrolných sér a vzoriek sa musí vykonať naraz.

Každá skúmvka sa môže použiť len raz.

#### 1. Kalibračná krivka:

Pridajte pipetou 50 μl každého kalibrátora do príslušných skúmviek.

#### 2. Vzorky a kontrolné vzorky:

Pridajte pipetou 50 μl každej vzorky alebo kontrolnej vzorky do príslušných skúmviek.

3. Do každej skúmvky pridajte 400 μl analogickej stopovacej látky TESTOSTERÓN <sup>125</sup>I. Odstredte a zakryte.

4. Inkubujte počas 2 hodín pri teplote 37 ± 2 °C.

5. Opatrne odsajte roztok zo všetkých skúmviek. (Okrem skúmviek celkového množstva).

6. Do každej skúmvky pridajte 2 ml premývacieho roztoku. Opatrne odsajte. (Okrem skúmviek celkového množstva).

7. Do každej skúmvky pridajte 2 ml premývacieho roztoku. Opatrne odsajte. (Okrem skúmviek celkového množstva).

8. Počítajte rádioaktivitu ustálenú v každej skúmvke aspoň počas 60 sekúnd.

### 5.3. Spracovanie údajov:

Stanovte priemer počítania pre každý súbor duplicitných skúmviek.

Vypočítajte pomer B/B0 nasledovne:

$B/B0 \% = [\text{Cal alebo Smp cpm}/B0 (\text{Cal } 0) \text{ cpm}] \times 100$

Nakreslite kalibračnú krivku nanosením pomeru B/B0 % (línerána stupnica) získaného pre každý kalibrátor oproti jeho príslušnej koncentrácii vyjadrenej v pg/ml (logaritmická stupnica). Koncentrácie voľného testosterónu vo vzorkách sa môžu odčítať priamo z kalibračnej krivky.

Ak sa na vypočítanie výsledkov používa počítač, údaje sa môžu vložiť do vhodnej rovnice: hladký splajn.



#### 5.4. Príklad typického rozboru:

	Obsah (pg/ml)	cpm 1. duplikát	cpm 2. duplikát	Priemer počítania	B/Bo (%)	Voľný testosterón (pg/ml)
Celkové množstvo	-	52039	51647	51843	-	-
Cal 0	0	25839	25961	25900	100	-
Cal 1	0,3	21086	21170	21128	81,6	-
Cal 2	1	16509	16203	16356	63,2	-
Cal 3	3	12437	12428	12433	48	-
Cal 4	10	8317	7916	8117	31,3	-
Cal 5	30	5017	4711	4864	18,8	-
Cal 6	90	2611	2528	2570	9,9	-
C 1 nízky	1,5 – 2,9	13461	13557	13508	52,2	2,3
C 2 vysoký	15 – 29	5736	5002	5369	20,8	21
Vzorka 1		17478	16742	16975	65,5	0,86
Vzorka 2		7538	7423	7481	28,9	11,5
Vzorka 3		4681	4645	4663	24,3	33

Príklad typického rozboru, nepoužívajte pre výpočty

## 6. CHARAKTERISTIKY SPOL'AHLIVOSTI:

### 6.1. Špecifickosť

Steroid	% krížovej reaktivity
Testosterón	100
5 $\alpha$ DHT	0,006
andostendión	0,02
$\beta$ estradiol	0,0003
DHEA-S	0,000001
Androsterón, Kortikosterón, 11 DOC, estriol, estrón, progesterón, DHEA	N.D.

### 6.2. Detekčný limit

LOB (limit slepých vzoriek – „Limit of Blank“) sa vypočítal na základe viacnásobného merania slepých vzoriek a vypočítal sa ako priemer - 1,65 štandardnej odchýlky distribúcie týchto hodnôt. LOB sa vypočítal na 0,08 pg/ml. LOD (limit detekcie) sa vypočítal ako LOB - 1,65 štandardnej odchýlky vzorky s nízkou koncentráciou testovanej v 10 rôznych pokusoch. LOD sa vypočítal na 0,40 pg/ml.

### 6.3. Reprodukovateľnosť:

	V rámci variability rozboru		Medzi variabilitou rozboru	
	Priemerná hodnota (pg/ml)	10 replikátov (% CV)	Priemerná hodnota (pg/ml)	7 samostatných duplicitných rozborov (% CV)
Rozsah 1	29,86	9,3	0,73	19,5
Rozsah 2	8,17	5,7	10,89	7,3
Rozsah 3	0,63	11,5	33,94	9,1

## 7. OBMEDZENIE POSTUPU

- Výsledky získané z tejto alebo akejkoľvek inej diagnostickej súpravy by sa mali použiť a vykladať iba v kontexte celkového klinického obrazu.
- Nepoužívajte lipemické, hemolyzované, ikerické ani kalné vzorky.
- Nepoužívajte vzorky plazmy

## 8. OČAKÁVANÉ HODNOTY

Odporúčame, aby každé laboratórium stanovilo svoje vlastné referenčné hodnoty.

Veková skupina	Muži			Ženy		
	Počet subjektov	Medián pg/ml	Absolútny rozsah pg/ml	Počet subjektov	Medián pg/ml	Absolútny rozsah pg/ml
<15 rokov	49	0,3	ND - 1,8	45	0,3	ND -2,7
15-39 rokov	154	13,3	5,4 - 40,0	145	2,3	ND- 4,6
40-59 rokov	97	11,8	3,6 – 25,7	77	1,5	ND- 4,0
> 60 rokov	87	9,7	1,5 – 28,8	92	1,4	ND -5,0

## 9. UPOZORNENIA A PREVENTÍVNE OPATRENIA

### Len na DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

#### UPOZORNENIE: Rádioaktívny materiál

Táto sada obsahuje <sup>125</sup>I (polčas: 60 dní), emitujúci ionizujúce X (28 keV) a  $\gamma$  (35,5 keV) žiarenia.

Tento rádioaktívny produkt sa môže odovzdať len oprávneným osobám, ktoré ho môžu používať; nákup, skladovanie, používanie a výmenu rádioaktívnych produktov upravujú právne predpisy krajiny koncového používateľa. Produkt sa v žiadnom prípade nesmie podávať ľuďom ani zvieratám.

Akákoľvek manipulácia s rádioaktívnymi látkami sa musí vykonávať v určených priestoroch, mimo bežne vykonávanej práce. V laboratóriu musí byť kniha záznamov o prijatí a skladovaní rádioaktívnych materiálov. Laboratórne vybavenie a sklo, ktoré by sa mohli kontaminovať rádioaktívnymi látkami, musia byť oddelené, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii rôznymi rádioizotopmi.

Prípadné rádioaktívne úniky sa musia ihneď odstrániť v súlade s postupmi pre radiačnú bezpečnosť. Rádioaktívny odpad sa musí zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi orgánov príslušných pre dané laboratórium. Dodržiavanie základných pravidiel pre radiačnú bezpečnosť poskytujúce primeranú ochranu.

V pracovných priestoroch nefajčte, nepite, nejedzte a nepoužívajte kozmetiku. Nepipetujte ústami. Používajte ochranné odevy a jednorazové rukavice. Viac informácií nájdete v karte bezpečnostných údajov o materiáli (MSDS).

#### UPOZORNENIE: Azid sodný

Niektoré zložky obsahujú azid sodný ako konzervačnú látku (NaN<sub>3</sub> < 0,1 %). Činidlá zlikvidujte spláchnutím veľkým množstvom vody do vodovodného odtoku.

#### UPOZORNENIE: Potenciálne infekčný materiál

So všetkými zložkami (a všetkými vzorkami pacientov) manipulujte tak, ako by boli schopné prenášať vírusové ochorenia, ako napríklad hepatitída B a C a získaný syndróm imunitnej nedostatočnosti (AIDS).

Zdrojový materiál získaný z ľudských telesných tekutín alebo orgánov používaný na prípravu tejto sady bol otestovaný s negatívnym výsledkom na HBsAg a anti-HCV imunologickým testovaním. Žiadny známy test však nedokáže zaručiť, že takýto materiál neobsahuje zdroj vírusovej hepatitídy.

Podobne boli všetky ľudské materiály použité na prípravu tejto sady skríňované na prítomnosť protilátok proti HIV-1 a -2 imunoenzymatickou reakciou s negatívnym výsledkom. Absencia týchto protilátok však nedokáže zaručiť absenciu vírusového pôvodcu zodpovedného za získaný syndróm imunitnej nedostatočnosti.

## 10. LITERATÚRA

- Abraham G., Manilinos F. and Garza R. : Handbook of radioimmunoassay . Abraham G.(eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 599, 1977
- Vermeulen A. : Androgen secretion by adrenals and gonads . in : Malesh V, Greenblatt RB, editors. Hirsutism and virilism . Boston : John Wright - PSG inc., 17, 1983
- Green PJ. : Free testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis .Clinical Chemistry , 28 , 1237 , 1982
- Haning RV. : Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate Fertility and Sterility , 36 , 757 , 1981
- Biffignandi P., Massucchetti C., Molinatti GM. : Female hirsutism : pathophysiological consideration and therapeutic implications. Endocrine reviews , 5 , 498 , 1984.
- Manni A., Partridge WM., Cefalu W., Nisula BC. Bardin CW., Santner SJ., Santen R.J. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 61 , 705 , 1985.
- Ekins RP : Free hormones in blood : concept and measurement. J. Clin. Immunoassay 7 , 163 , 1984.
- Nieschlag E. and Wickings EJ. : Role of testosterone in evaluation of testicular function. Radioassay systems in Clinical endocrinology , G. Abraham , ed. New York , 169 , 1981

Ďalšie preklady tohto návodu na použitie sú k dispozícii na stiahnutie na našej webovej stránke: <https://www.diasource-diagnostics.com/>