
TESTO-CTK
(P3093)

DiaSorin

English	p. 1
Italiano.....	p. 9
Français	p. 17
Deutsch.....	p. 26
Español	p. 35
Ελληνικά.....	p. 44

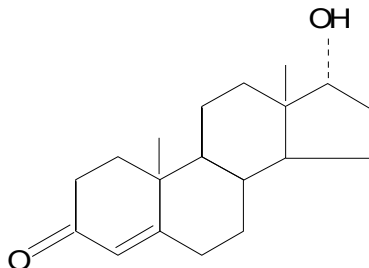
**TESTOSTERONE DIRECT
RADIOIMMUNOASSAY KIT**

**Procedure for quantitative determination of testosterone
in human serum or plasma samples**

For in vitro use only

1. INTRODUCTION

Testosterone, the main androgen produced by the Leydig cells of the testes, is a steroid hormone of molecular weight 288.4 daltons, having the following chemical formula:



Though mainly synthesized in the testes, testosterone is also produced – in much smaller amounts – in the adrenal cortex and in the ovaries. This is because a common meta-bolic pathway is followed when a steroid hormone is synthesized.

Testosterone is transported in the plasma by a beta-globulin, called testosterone-binding globulin. It is estimated that about 97-99% of the circulating testosterone is bound. The remainder, present as free component, is assumed to be the metabolically active portion of the total testosterone level.

To perform its biological activities, testosterone appears to require conversion into an active and more potent metabolite, dihydrotestosterone, and this can occur both in the circulation and in target tissues.

At the time of puberty, pituitary gonadotrophins increase, stimulating testicular maturation: LH acts directly on the interstitial mesenchymal elements, causing them to secrete testosterone and estrogens, as they develop into mature Leydig cells. FSH acts on the seminiferous tubules to induce and maintain normal spermatogenesis.

At the onset of puberty, testosterone stimulates the development of male sex characteristics (such as external genitalia, accessory sex organs, hair growth, linear growth, voice timbre, psyche, muscle and bone tissue mass) which it will maintain throughout life.

The age at which maximum testosterone levels are observed varies from 15-20 to 25 years according to the theories. Testosterone is secreted episodically throughout the day, so that multiple peaks can be observed.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The principle of the assay is based on the competition between labelled testosterone and testosterone contained in calibrators or samples to be assayed for a fixed and limited number of antibody binding sites. After the incubation, the amount of labelled testosterone bound to the antibody on the tube walls is inversely related to the concentration of unlabelled testosterone present in calibrators or samples. The method adopted for B/F separation is based on the use of antibody-coated tubes, where the antibody is coated on the tube walls.

3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Coated tubes	100
¹²⁵ I-labelled testosterone	1 bottle
Testosterone calibrators	7 vials
Control serum	1 vial
Number of tubes	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 4 assay runs when used throughout the day at room temperature and stored overnight at 2-8°C.

Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

3.1. Coated tubes

The inner surface of each tube is coated with testosterone antiserum raised in rabbits.

Before use, bring the coated tubes to room temperature prior to opening the box, to avoid condensation of humidity.

Securely reseal the box containing unused tubes. Do not mix different batches of coated tubes.

3.2. ¹²⁵I-labelled testosterone (red): ready-to-use reagent

The bottle contains 52 mL testosterone labelled with ¹²⁵I, BSA, phosphate-citrate buffer, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 59 kBq (1.6 µCi) or less on the calibration date.

3.3. Testosterone calibrators: ready-to-use reagent

Each vial contains steroid-free serum, preservatives and testosterone at the following concentrations: 0 - 0.25 - 0.5 - 1.0 - 2.5 - 5.0 - 10.0 ng/mL (0 - 0.87 - 1.73 - 3.47 - 8.7 - 17.3 - 34.7 nmol/L).

The zero calibrator vial contains 1 mL in human serum; the 1-6 calibrator vials contain 0.5 mL in newborn calf serum.

As no international standard preparation is currently available, the kit calibrators are referenced to an internal reference preparation (99% purity by HPLC). *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

3.4. Control serum: lyophilized reagent

The vial contains testosterone, human serum and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. The resulting solution is stable for one week at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Micropipettes with disposable tips (50, 500 µL) (50 µL: trueness ± 3%, precision 2%; 500 µL: trueness ± 2%, precision 1%).
- Test tube rack.
- Vortex mixer.
- Thermostatically-controlled heating block or water bath capable of maintaining 37° ± 1°C.
- Device for aspiration of incubation mixture.
- Gamma counter suitable for counting ¹²⁵I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Either human serum or plasma may be used. The anticoagulants EDTA and heparin have been tested and may be used with this assay. Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

If testosterone levels greater than 10 ng/mL are expected, the samples should be diluted with the zero calibrator.

6. ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time. Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Dispense reagents *in the bottom of coated tubes*. Operate according to the following scheme:

reagents	tubes	Calibrators 0-6	Samples
Calibrators		50 µL	–
Samples		–	50 µL
Tracer		500 µL	500 µL

- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate for 3 hours at 37°C**.
- Carefully **aspirate** the incubation mixture. *Be sure that the aspirator tip touches the bottom of the coated tube so that all the liquid is removed. Failure to remove adhering solution adequately may result in poor reproducibility and spurious results. No trace of dye should still be visible.*
- **Measure the radioactivity** of tubes.

7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Compute the B/Bo ratio for each calibrator and unknown sample as follows:

$$B/Bo\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{zero calibrator mean counts}} \times 100$$

Plot in semilog or linear-linear coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of testosterone concentration expressed as ng/mL or nmol/L on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 1). Directly from the calibration curve, read the testosterone concentration of each sample expressed as ng/mL or nmol/L. If the sample was diluted, the testosterone concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the dilution factor.

Calculation example

The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.

Description	cpm	B/Bo x 100
Zero calibrator	10,559	100
0.25 ng/mL - 0.87 nmol/L	7,816	74.0
0.5 ng/mL - 1.73 nmol/L	6,999	66.3
1.0 ng/mL - 3.47 nmol/L	5,537	52.4
2.5 ng/mL - 8.7 nmol/L	4,184	39.6
5.0 ng/mL - 17.3 nmol/L	3,347	31.7
10.0 ng/mL - 34.7 nmol/L	2,350	22.3
Sample	5,376	50.9

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 1.2 ng/mL (4.3 nmol/L) testosterone.

B/Bo x 100

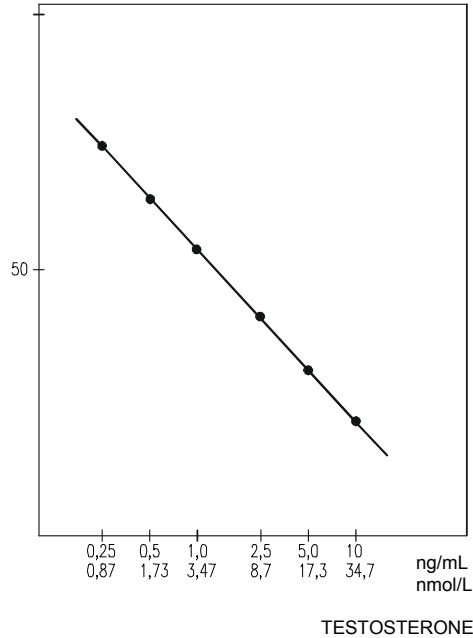


Fig. 1

8. EXPECTED VALUES

The ranges given below are merely indicative: each laboratory should establish its own reference ranges.

Normal males	2.8 - 9.0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Normal females	0.1 - 1.0 ng/mL	0.3 - 3.5 nmol/L

Conversion to nmol testosterone/L is possible using the following formula:
 $\text{nmol testosterone/L} = \text{ng testosterone/mL} \times 3.47$.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

Interference. Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by anticoagulants (EDTA, heparin), haemolysis (up to 200 mg/dL haemoglobin), lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin). Testosterone values determined in plasma samples obtained with citrate are about 30% lower than those determined in serum samples.

Cross-reactions. The percentage of cross-reactions, calculated according to Abraham, shows the specificity of the antiserum used.

- Testosterone	100%
- 5-dihydrotestosterone	6.9%
- Androstenedione	1.1%
- 19-norethisterone	0.33%
- Danazol	0.15%
- Dehydroepiandrosterone	$4.5 \times 10^{-2}\%$
- 5 alpha-androstan, 3 alpha, 17 beta diol	$2.5 \times 10^{-2}\%$
- Testosterone glucuronide	$2.0 \times 10^{-2}\%$
- Cortisol	} $< 1.0 \times 10^{-2}\%$
- Corticosterone	
- Cholesterol	
- Deoxycorticosterone	
- 17-epitestosterone	
- Testosterone sulphate	
- Androsterone	
- 3 beta-oxyandrostan, 5 beta, 17 one	
- Progesterone	
- Estrone	
- Estradiol, Ethynylestradiol	
- Estriol	
- Dexamethasone	

9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 0.02 ng/mL (0.07 nmol/L) at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations below zero.

9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	14	14	14
Mean (ng/mL)	1.13	3.61	7.27
Standard deviation	0.091	0.158	0.262
Coefficient of variation (%)	8.06	4.38	3.61

Reproducibility	D	E	F	G
Number of determinations	10	10	10	10
Mean (ng/mL)	0.419	2.164	4.650	9.342
Standard deviation	0.032	0.135	0.339	0.661
Coefficient of variation (%)	7.58	6.23	7.28	7.08

9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery tests.

Dilution test. Two sera with high testosterone concentration were tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, ng/mL	Measured concentration, ng/mL	% Recovery
neat	–	5.38	–
1:2	2.69	2.60	96.7
1:4	1.34	1.30	96.7
1:8	0.67	0.67	99.7
1:16	0.34	0.34	101.2
1:32	0.17	0.18	107.1
neat	–	5.13	–
1:2	2.57	2.79	108.8
1:4	1.28	1.32	102.9
1:8	0.64	0.68	106.0
1:16	0.32	0.31	96.7
1:32	0.16	0.15	93.6

Recovery test. Two sera with low testosterone concentration were tested as such and after mixing with increasing amounts of testosterone.

Added concentration, ng/mL	Expected concentration, ng/mL	Measured concentration, ng/mL	% Recovery
–	–	0.30	–
3.88	4.18	4.10	98.1
2.46	2.76	2.50	90.6
1.11	1.41	1.50	106.4
0.69	0.99	1.00	101.0
0.39	0.69	0.70	101.4
–	–	4.84	–
3.88	8.72	8.90	102.1
2.46	7.30	7.40	101.4
1.11	5.95	6.40	107.6
0.69	5.53	5.70	103.1
0.39	5.23	5.30	101.3

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration of incubation mixture
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Test components contain sodium azide as a preservative. Because sodium azide may form explosive lead or copper azide in plumbing, it is recommended that drains be thoroughly flushed with water after disposal of solutions containing sodium azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Harmful if swallowed.

R 31 – Contact with acids liberates toxic gas.

S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Sodium merthiolate (Council Directive 99/45/EC):

R 20/21/22 – Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R 33 – Danger of cumulative effects.

S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 1.7 μCi (63 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. It's receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state of which the Commission has entered into an agreement for the

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - RECONSTITUTE THE CONTROL SERUM.
- 2 - IDENTIFY COATED TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS ACCORDING TO THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

	TUBES	CAL 0-6	SAMPLES
REAGENTS			
CALIBRATORS		50 μL	-
SAMPLES		-	50 μL
TRACER		500 μL	500 μL

- 4 - INCUBATE FOR 3 HOURS AT 37°C.
- 5 - ASPIRATE THE INCUBATION MIXTURE.
- 6 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF TUBES.

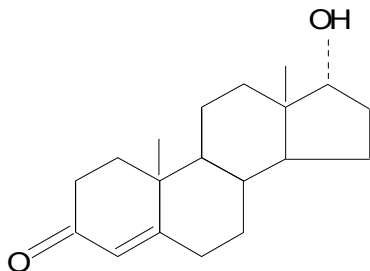
**KIT PER IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO
DIRETTO DEL TESTOSTERONE**

**Procedimento per l'analisi quantitativa del testosterone
in campioni di siero o plasma umano**

Solo per uso in vitro

1. INTRODUZIONE

Il testosterone, l'androgeno principale prodotto dalle cellule di Leydig dei testicoli, è un ormone steroideo di peso molecolare 288,4 dalton, con la seguente formula chimica:



Sebbene sintetizzato principalmente nei testicoli, il testosterone è prodotto – in quantità molto basse – anche nella corteccia surrenale e nelle ovaie. Questo fatto si verifica perché la via metabolica seguita per sintetizzare un qualsivoglia ormone steroideo è almeno in parte comune a quella degli altri steroidi.

Il testosterone è trasportato nel plasma da una beta-globulina, designata col nome di testosterone-binding globulin (globulina testosterone-legante). Si crede che circa il 97-99% del testosterone circolante sia legato. Il rimanente, presente come componente libera, è considerato la porzione metabolicamente attiva del testosterone totale.

Per estrinsecare la sua attività biologica, il testosterone sembra dover essere convertito in un metabolita attivo e molto più potente, il diidrottestosterone. Questa conversione si attua sia nella circolazione che nei tessuti bersaglio.

Alla pubertà, le gonadotropine ipofisarie aumentano, stimolando la maturazione testicolare: l'LH agisce direttamente sugli elementi mesenchimali interstiziali che si sviluppano in cellule di Leydig mature e secernono testosterone ed estrogeni. L'FSH agisce sui tubuli seminiferi inducendo e mantenendo la spermatogenesi normale.

All'inizio della pubertà, il testosterone stimola lo sviluppo dei caratteri sessuali maschili (come genitali esterni, organi sessuali accessori, crescita lineare, crescita dei peli, timbro della voce, psiche e massa dei tessuti muscolare e osseo) che verranno mantenuti per tutta la vita.

L'età in cui si osservano i livelli massimi di testosterone varia da 15-20 a 25 anni secondo le teorie. Il testosterone è secreto episodicamente durante il giorno di modo che si possono osservare picchi multipli.

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il principio del dosaggio consiste nella competizione tra testosterone marcato e testosterone contenuto nei calibratori o nei campioni per il numero fisso e limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione, la quantità di testosterone marcato legata all'anticorpo fissato alle provette sensibilizzate è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone non marcato presente nei calibratori o nei campioni. Il metodo adottato per la separazione libero/legato è basato sull'impiego delle provette sensibilizzate, dove l'anticorpo è fissato alle pareti delle provette.

3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Provette sensibilizzate	100
Testosterone marcato con ¹²⁵ I	1 flacone
Calibratori di testosterone	7 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Numero di dosaggi	100

MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 4 serie analitiche se utilizzato durante il giorno a temperatura ambiente e conservato durante la notte a 2-8°C.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma. Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.

3.1. Provee sensibilizzate

La superficie interna di ciascuna provetta è rivestita con antisiero da coniglio anti-testosterone. Al momento dell'uso, portare le provette sensibilizzate a temperatura ambiente prima di aprire il contenitore, per evitare condensazione d'umidità.

Le provette non utilizzate vanno conservate nel contenitore ben chiuso. Non mescolare lotti differenti di provette sensibilizzate.

3.2. Testosterone marcato con ¹²⁵I (rosso): reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 52 mL di testosterone marcato con ¹²⁵I, sieroalbumina bovina, tampone fosfato-citrato, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 59 kBq (1,6 µCi) alla data di taratura.

3.3. Calibratori di testosterone: reattivo pronto per l'uso

Ogni flacone contiene testosterone, siero deprivato di steroidi e conservanti. Le concentrazioni sono le seguenti: 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 ng/mL (0 - 0,87 - 1,73 - 3,47 - 8,7 - 17,3 - 34,7 nmol/L).

Il volume del calibratore zero è 1 mL in siero umano; il volume dei calibratori 1-6 è 0,5 mL in siero bovino neonatale.

Poiché non è attualmente disponibile uno standard internazionale, i calibratori del kit sono tarati contro una preparazione di riferimento interna (pura al 99% in HPLC). I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.

3.4. Siero di controllo: reattivo liofilo

Il flacone contiene testosterone, siero umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per una settimana a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI

- Acqua distillata e deionizzata.
- Micropipette con puntali monouso da 50 µL (esattezza ± 3%, precisione 2%) e 500 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Portaprovette.
- Agitatore Vortex.
- Sistema termostatico in grado di mantenere 37° ± 1°C.
- Sistema per aspirare la miscela di incubazione.
- Contatore gamma per contare lo iodio ¹²⁵I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio può essere effettuato in campioni di siero o plasma umano. Possono essere utilizzati anticoagulanti come EDTA e eparina. Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Se si prevedono livelli di testosterone maggiori di 10 ng/mL, diluire con il calibratore zero.

6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Distribuire i reattivi *sul fondo delle provette sensibilizzate*. Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Calibratori 0-6	Campioni
Calibratori	50 µL	-
Campioni	-	50 µL
Tracciante	500 µL	500 µL

- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex ed **incubare per 3 ore a 37°C**.
- **Aspirare** accuratamente la miscela d'incubazione. *Verificare che l'eliminazione del liquido sia completa, assicurandosi che il puntale della pipetta di aspirazione tocchi il fondo delle provette sensibilizzate. La presenza di gocce aderenti alle pareti delle provette sensibilizzate può provocare scarsa riproducibilità o risultati non affidabili. Non deve restare traccia del colorante.*
- **Misurare la radioattività** delle provette.

7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette dopo aver sottratto il valore del fondo. Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto al calibratore zero:

$$B/B_0\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio calibratore zero}} \times 100$$

Riportare su grafico semilog o lineare-lineare la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di testosterone espressa in ng/mL o nmol/L sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 1). Direttamente dalla curva di taratura

leggere la concentrazione di testosterone di ciascun campione espressa in ng/mL o nmol/L. Se il campione è stato diluito, la concentrazione di testosterone trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/Bo x 100
Calibratore zero	10.559	100
0,25 ng/mL - 0,87 nmol/L	7.816	74,0
0,5 ng/mL - 1,73 nmol/L	6.999	66,3
1,0 ng/mL - 3,47 nmol/L	5.537	52,4
2,5 ng/mL - 8,7 nmol/L	4.184	39,6
5,0 ng/mL - 17,3 nmol/L	3.347	31,7
10,0 ng/mL - 34,7 nmol/L	2.350	22,3
Campione	5.376	50,9

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 1,2 ng/mL (4,3 nmol/L) di testosterone.

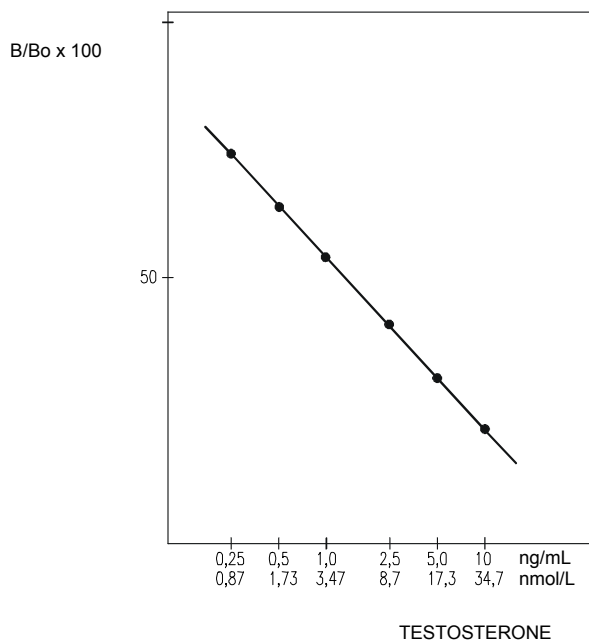


Fig. 1

8. DATI CLINICI

I valori riportati nella tabella seguente sono solamente indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

Uomini normali	2,8 - 9,0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Donne normali	0,1 - 1,0 ng/mL	0,3 - 3,5 nmol/L

La conversione in nmol testosterone/L si esegue con la formula seguente:
 $nmol\ testosterone/L = ng\ testosterone/mL \times 3,47$.

9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

Interferenze. Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da anticoagulanti (EDTA, eparina), emolisi (fino a 200 mg/dL di emoglobina), lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina) I valori di testosterone ottenuti con i campioni di plasma contenenti citrato risultano inferiori di circa il 30% a quelli ottenuti con i campioni di siero.

Reazioni crociate. Le percentuali di reazioni crociate, calcolate secondo Abraham, mostrano la specificità dell'antisiero usato.

- Testosterone	100%
- 5-diidrotestosterone	6,9%
- Androstendione	1,1%
- 19-noretisterone	0,33%
- Danazolo	0,15%
- Deidroepiandrosterone	$4,5 \times 10^{-2}\%$
- 5 alfa-androstan, 3 alfa, 17 beta diol	$2,5 \times 10^{-2}\%$
- Testosterone glucuronato	$2,0 \times 10^{-2}\%$
- Cortisolo	} < $1,0 \times 10^{-2}\%$
- Corticosterone	
- Colesterolo	
- Desossicorticosterone	
- 17-epitestosterone	
- Testosterone solfato	
- Androsterone	
- 3 beta-ossandrostan, 5 beta, 17 one	
- Progesterone	
- Estrone	
- Estradiolo, Etinilestradiolo	
- Estriolo	
- Desametazone	

9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 0,02 ng/mL (0,07 nmol/L) al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sotto lo zero.

9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	14	14	14
Media (ng/mL)	1,13	3,61	7,27
Deviazione standard	0,091	0,158	0,262
Coefficiente di variazione (%)	8,06	4,38	3,61

Riproducibilità	D	E	F	G
Numero di determinazioni	10	10	10	10
Media (ng/mL)	0,419	2,164	4,650	9,342
Deviazione standard	0,032	0,135	0,339	0,661
Coefficiente di variazione (%)	7,58	6,23	7,28	7,08

9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante i test di diluizione e recupero.

Test di diluizione. Sono state dosate diluizioni scalari di due sieri a concentrazione elevata di testosterone effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, ng/mL	Concentrazione misurata, ng/mL	% Recupero
in toto	–	5,38	–
1:2	2,69	2,60	96,7
1:4	1,34	1,30	96,7
1:8	0,67	0,67	99,7
1:16	0,34	0,34	101,2
1:32	0,17	0,18	107,1
in toto	–	5,13	–
1:2	2,57	2,79	108,8
1:4	1,28	1,32	102,9
1:8	0,64	0,68	106,0
1:16	0,32	0,31	96,7
1:32	0,16	0,15	93,6

Test di recupero. Sono stati dosati due sieri a bassa concentrazione di testosterone sia in toto sia dopo averli addizionati con quantità crescenti di testosterone.

Concentrazione addizionata, ng/mL	Concentrazione, attesa, ng/mL	Concentrazione misurata, ng/mL	% Recupero
–	–	0,30	–
3,88	4,18	4,10	98,1
2,46	2,76	2,50	90,6
1,11	1,41	1,50	106,4
0,69	0,99	1,00	101,0
0,39	0,69	0,70	101,4
–	–	4,84	–
3,88	8,72	8,90	102,1
2,46	7,30	7,40	101,4
1,11	5,95	6,40	107,6
0,69	5,53	5,70	103,1
0,39	5,23	5,30	101,3

10. LIMITI DEL DOSAGGIO

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelamento dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere un'adeguata manualità tecnica. In particolare, è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione, distribuzione ed aspirazione dei reattivi.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti di inquinamento batterico
- aspirazione non adeguata della miscela di incubazione
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I componenti del kit contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può formare azidi di piombo o di rame esplosive nelle tubature, si raccomanda di far fluire acqua in abbondanza negli scarichi dopo l'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Nocivo per ingestione.
R 31 – A contatto con acidi libera gas tossico.
S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.
S 45 – In caso d'incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Sodio mertiolato (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.
R 33 – Pericolo d'effetti cumulativi.
S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.
S 45 – In caso d'incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario d'indicatori biologici.

13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1,7 μCi (63 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1 - RICOSTITUIRE IL SIERO DI CONTROLLO.
- 2 - CONTRASSEGNARE LE PROVETTE SENSIBILIZZATE IN DUPLICATO.
- 3 - DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE E AGITARE LA MISCELA D'INCUBAZIONE:

	PROVETTE	CAL 0-6	CAMPIONI
REATTIVI			
CALIBRATORS		50 μL	-
SAMPLES		-	50 μL
TRACER		500 μL	500 μL

- 4 - INCUBARE PER 3 ORE A 37°C.
- 5 - ASPIRARE LA MISCELA D'INCUBAZIONE.
- 6 - MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DELLE PROVETTE.

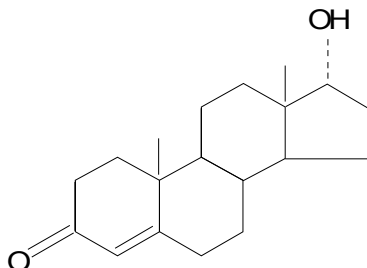
TROUSSE POUR LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DIRECT DE LA TESTOSTERONE

Technique pour la détermination quantitative de la testostérone dans le sérum ou dans le plasma humain

Usage in vitro

1. INTRODUCTION

La testostérone, l'androgène principal produit par les cellules de Leydig des testicules, est une hormone stéroïde ayant un poids moléculaire de 288,4 daltons et la formule chimique suivante:



Synthétisée principalement dans les testicules, la testostérone l'est également dans la corticosurrénale et dans les ovaires bien qu'en très faible quantité. Ceci parce que la voie métabolique suivie pour synthétiser la plupart des hormones stéroïdes est commune.

La testostérone est transportée dans le plasma par une bêta-globuline appelée testostérone-binding globulin. On suppose qu'environ 97-99% de la testostérone circulante est liée. On considère que la partie restante, composante libre, représente la portion active, du point de vue métabolique, de la testostérone totale.

Pour accomplir son activité biologique, la testostérone semble devoir être transformée en un métabolite actif et beaucoup plus puissant, la dihydrotestostérone. Cette conversion a lieu aussi bien dans la circulation que dans les tissuscibles.

Pendant la puberté les gonadotrophines hypophysaires augmentent, stimulant ainsi la maturation testiculaire: la LH agit directement sur les éléments mésenchymateux interstitiels qui se développent dans les cellules de Leydig mûres et sécrètent la testostérone et les oestrogènes. La FSH intervient sur les tubes séminifères déterminant et maintenant ainsi une spermatogénèse normale.

Au début de la puberté, la testostérone stimule le développement des caractères sexuels masculins (tels que les organes génitaux externes, les organes sexuels accessoires, la croissance, le système pileux, le timbre de la voix, le psychisme et la masse des tissus musculaire et osseux) qui seront maintenus pendant toute la vie.

L'âge où la concentration de testostérone est maximale se situe entre 15-20 et 25 ans (selon les diverses théories). La testostérone étant sécrétée de façon épisodique durant la journée, on peut observer des pics multiples.

2. PRINCIPE DU DOSAGE

Le principe du dosage repose sur la compétition entre, d'une part, la testostérone marquée et, de l'autre, la testostérone contenue dans les étalons ou les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps, en nombre limité et fixe. Après l'incubation, la quantité de testostérone marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone non marquée présente dans les étalons ou les échantillons. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi de tubes revêtus sur les parois desquels l'anticorps est fixé.

3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes revêtus	100
Testostérone marquée à I^{125}	1 flacon
Etalons testostérone	7 flacons
Sérum contrôle	1 flacon
Nombre de dosages	100

STOCKAGE: Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 4 séries analytiques si elle est utilisée pendant le jour à température ambiante et conservée pendant la nuit à 2-8°C.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

3.1. Tubes revêtus

La surface interne de chaque tube est revêtue d'antisérum de lapin anti-testostérone.

Au moment de l'emploi, amener les tubes revêtus à température ambiante avant d'ouvrir leur boîte afin d'éviter tout phénomène de condensation.

Conserver les tubes non utilisés dans la boîte en s'assurant que celle-ci est dûment fermée. Ne pas mélanger des tubes revêtus provenant de lots différents.

3.2. Testostérone marquée à I^{125} (rouge): réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 52 mL de testostérone marquée à l'iode ^{125}I , de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté-citraté, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 59 kBq (1,6 μ Ci) à la date d'étalonnage.

3.3. Etalons testostérone: réactif prêt à l'emploi

Chaque flacon contient de la testostérone, du sérum exempt de stéroïdes et des conservateurs. Les concentrations sont les suivantes: 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 ng/mL (0 - 0,87 - 1,73 - 3,47 - 8,7 - 17,3 - 34,7 nmol/L).

Le volume de l'étalon zéro est de 1 mL dans du sérum humain. Le volume des étalons 1-6 est de 0,5 mL dans du sérum de veau nouveau-né.

Une préparation étalon internationale n'étant pas actuellement disponible, les étalons de la trousse sont étalonnés par rapport à une préparation interne de référence (pure à 99% avec HPLC). *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

3.4. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient de la testostérone, du sérum d'origine humaine et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables. Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue se conserve à 2-8°C pendant une semaine; la congeler divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Nocif en cas d'ingestion.
- R 31 – Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.
- S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
- S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Merthiolate de sodium (Council Directive 99/45/EC):

R 20/21/22 – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

R 33 – Danger d'effets cumulatifs.

S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

Réactifs contenant de l'Iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1,7 µCi (63 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radio-activité théorique de la trousse.

Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPRI⁽¹⁾ et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants.

Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousseaux conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 50 µL (justesse ± 3%, fidélité 2%) et 500 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Portoir pour tubes.
- Mélangeur Vortex.
- Incubateur thermostaté ou bain-marie capable de maintenir 37° ± 1°C.
- Système d'aspiration du mélange d'incubation.
- Compteur gamma pour compter l'iode ¹²⁵I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humain. On peut employer des anticoagulants comme l'EDTA ou l'héparine. Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

Si l'on prévoit des niveaux de testostérone supérieurs à 10 ng/mL, diluer avec l'étalon zéro.

9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption.

Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Distribuer les réactifs *au fond des tubes revêtus*. Procéder d'après le schéma suivant:

	tubes	Etalons 0-6	Echantillons
réactifs			
Etalons		50 µL	-
Echantillons		-	50 µL
Traceur		500 µL	500 µL

- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant 3 heures à 37°C**.

⁽¹⁾O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

- **Aspirer** soigneusement le mélange d'incubation. *Vérifier que le liquide soit éliminé complètement: pour cela il faut s'assurer que l'embout de la pipette d'aspiration touche le fond des tubes revêtus. La présence de gouttes adhérant aux parois des tubes revêtus peut entraîner une mauvaise reproductibilité ou fausser les résultats. Le colorant doit disparaître totalement.*
- **Mesurer la radioactivité** des tubes.

10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'étalon zéro:

$$B/B_0\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}} \times 100$$

Reporter sur du papier semilogarithmique ou bi-linéaire le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration de testostérone exprimée en ng/mL ou en nmol/L sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 1 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue. Lire la concentration de testostérone de chaque échantillon exprimée en ng/mL ou en nmol/L directement de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué, la concentration obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution.

Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/Bo x 100
Etalon zéro	10.559	100
0,25 ng/mL - 0,87 nmol/L	7.816	74,0
0,5 ng/mL - 1,73 nmol/L	6.999	66,3
1,0 ng/mL - 3,47 nmol/L	5.537	52,4
2,5 ng/mL - 8,7 nmol/L	4.184	39,6
5,0 ng/mL - 17,3 nmol/L	3.347	31,7
10,0 ng/mL - 34,7 nmol/L	2.350	22,3
Echantillon	5.376	50,9

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 1,2 ng/mL (4,3 nmol/L) de testostérone.

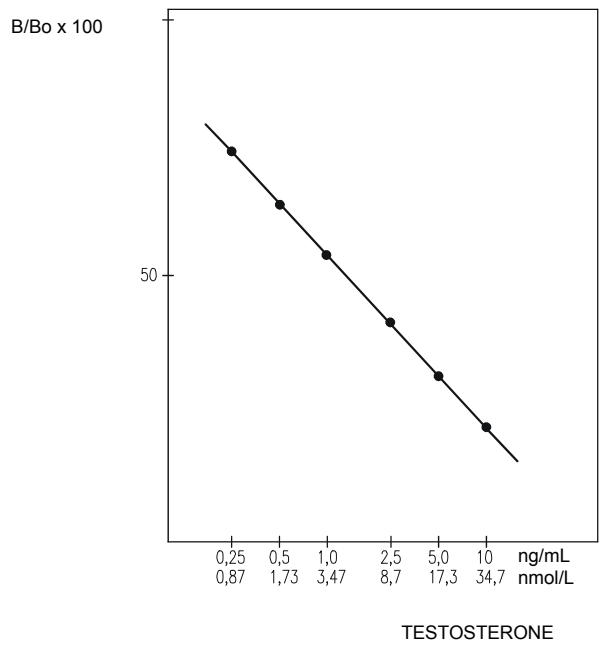


Fig. 1

11. VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs du tableau ci-dessous ne sont données qu'à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

Hommes normaux	2,8 – 9,0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Femmes normales	0,1 – 1,0 ng/mL	0,3 – 3,5 nmol/L

*Pour la conversion en nmol de testostérone/L, utiliser la formule suivante:
nmol de testostérone/L = ng de testostérone/mL x 3,47.*

12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

Interférences. Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par des anticoagulants (EDTA, héparine), par une hémolyse (jusqu'à 200 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou par une congélation des échantillons. Les valeurs de testostérone obtenues avec des échantillons de plasma sur citrate sont inférieures d'environ 30% aux valeurs obtenues avec des échantillons de sérum.

Réactions croisées. Les pourcentages de réactions croisées, calculés selon la méthode d'Abraham, montrent la spécificité de l'antisérum utilisé dans la trousse.

- Testostérone	100%
- 5-dihydrotestostérone	6,9%
- Androstènedione	1,1%
- 19-noréthistérone	0,33%
- Danazol	0,15%
- Déhydroépiandrostérone	$4,5 \times 10^{-2}\%$
- 5 alpha-androstane, 3 alpha, 17 bêta diol	$2,5 \times 10^{-2}\%$
- Glucurono-testostérone	$2,0 \times 10^{-2}\%$
- Cortisol	} $< 1,0 \times 10^{-2}\%$
- Corticostérone	
- Cholestérol	
- Désoxycorticostérone	
- 17-épitestostérone	
- Sulfate de testostérone	
- Androstérone	
- 3 bêta-oxyandrostane, 5 bêta, 17 one	
- Progestérone	
- Oestrone	
- Oestradiol, Éthinyl-oestradiol	
- Oestriol	
- Dexaméthasone	

12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 0,02 ng/mL (0,07 nmol/L) avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessous de zéro.

12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	14	14	14
Moyenne (ng/mL)	1,13	3,61	7,27
Ecart type	0,091	0,158	0,262
% de coefficient de variation	8,06	4,38	3,61

Reproductibilité	D	E	F	G
Nombre de déterminations	10	10	10	10
Moyenne (ng/mL)	0,419	2,164	4,650	9,342
Ecart type	0,032	0,135	0,339	0,661
% de coefficient de variation	7,58	6,23	7,28	7,08

12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide des tests de dilution et de surcharge.

Test de dilution. Le test de dilution a été réalisé sur deux sérums de concentration élevée en testostérone dilués en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, ng/mL	Concentration mesurée, ng/mL	% Récupération
pur	–	5,38	–
1/2	2,69	2,60	96,7
1/4	1,34	1,30	96,7
1/8	0,67	0,67	99,7
1/16	0,34	0,34	101,2
1/32	0,17	0,18	107,1
pur	–	5,13	–
1/2	2,57	2,79	108,8
1/4	1,28	1,32	102,9
1/8	0,64	0,68	106,0
1/16	0,32	0,31	96,7
1/32	0,16	0,15	93,6

Test de surcharge. Le test de surcharge a été réalisé sur deux sérums de faible concentration en testostérone soit purs soit par ajouts de quantités croissantes de testostérone.

Concentration ajoutée, ng/mL	Concentration attendue, ng/mL	Concentration mesurée, ng/mL	% Récupération
–	–	0,30	–
3,88	4,18	4,10	98,1
2,46	2,76	2,50	90,6
1,11	1,41	1,50	106,4
0,69	0,99	1,00	101,0
0,39	0,69	0,70	101,4
–	–	4,84	–
3,88	8,72	8,90	102,1
2,46	7,30	7,40	101,4
1,11	5,95	6,40	107,6
0,69	5,53	5,70	103,1
0,39	5,23	5,30	101,3

13. LIMITES DU DOSAGE

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration sont indispensables à la fiabilité du test. Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration inadéquate du mélange d'incubation
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - RECONSTITUER LE SÉRUM DE CONTRÔLE.
- 2 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPÈRE LES TUBES REVÊTUS EN DOUBLETS.
- 3 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

TUBES	ÉTALONS 0-6	ÉCHANTILLONS
RÉACTIFS		
ÉTALONS	50 µL	-
ÉCHANTILLONS	-	50 µL
TRACEUR	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBER PENDANT 3 HEURES À 37°C.
- 5 - ASPIRER LE MÉLANGE D'INCUBATION.
- 6 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DES TUBES.

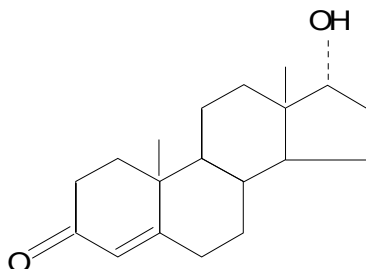
TESTOSTERON RIA

Methode zur quantitativen direkten radioimmunologischen Bestimmung des Testosterons in Humanserum oder -plasma

Nur für In-vitro-Diagnostik

1. EINLEITUNG

Testosteron, das wichtigste von den Leydig-Zellen der Hoden hergestellte Androgen, ist ein Steroidhormon mit einem Molekulargewicht von 288,4 Daltons und hat die folgende chemische Formel:



Testosteron wird hauptsächlich in den Hoden synthetisiert, wird aber auch – in sehr niedrigen Mengen – in der Nebennierenrinde und in den Ovarien hergestellt. Das geschieht, da der metabolische Weg zur Synthese von jedem Steroidhormon wenigstens zum Teil gleich wie bei den anderen Steroiden ist.

Testosteron wird im Plasma von einem Betaglobulin transportiert, das testostosterone-binding globulin (Testosteron-bindendes Globulin) genannt wird. Man glaubt, dass ungefähr 97-99% des Testosterons im Kreislauf gebunden ist. Das übrige Testosteron, als freier Bestandteil vorhanden, wird als das metabolisch aktive Teil des Gesamttestosterons betrachtet.

Um seine biologische Aktivität auszuführen, scheint Testosteron, zu einem aktiven und viel stärkeren Metaboliten umgewandelt werden zu müssen: Dihydrotestosteron. Diese Umwandlung erfolgt sowohl im Kreislauf, als auch in den Zielgeweben.

Bei der Pubertät vermehren sich die hypophysären Gonadotropine und regen die Hodenreifung an: LH wirkt direkt auf die mesenchymalen interstitiellen Zellen, die sich zu reifen Leydig-Zellen entwickeln und Testosteron und Östrogene absondern. FSH wirkt auf die Hodenkanälchen und induziert und erhält die normale Spermatogenese.

Bei Beginn der Pubertät regt Testosteron die Entwicklung der männlichen Geschlechtszeichen an (wie z.B. Außengenitalien, Nebengenitalien, lineares Wachstum, Wachstum der Haare, Ton der Stimme, Psyche und Masse der Muskel- und Knochengewebe), die für das ganze Leben erhalten bleiben.

Das Alter, in dem die max. Testosteron-Niveaus beobachtet werden, variiert zwischen 15-20 und 25 Jahren je nach den verschiedenen Theorien. Testosteron wird episodisch während des Tages abgesondert, so dass man Mehrspitzen beobachten kann.

2. TESTPRINZIP

Die Bestimmung basiert auf der Konkurrenz zwischen markiertem Testosteron und Testosteron in den Kalibratoren oder in den Proben um eine begrenzte Zahl an die Röhrenwand gebundener Antikörperbindungsstellen. Nach der Inkubation ist die Menge des wandgebundenen markierten Testosterons umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Testosterons in den Kalibratoren oder in den Proben. Als Trennmethode werden die beschichteten Röhren verwendet, bei denen die Antikörper an der Röhreninnenfläche fixiert sind.

3. LIEFERUMFANG DES TESTS

Beschichtete Röhrchen	100
¹²⁵ J-markiertes Testosteron	1 Fläschchen
Testosteron-Kalibratoren	7 Fläschchen
Kontrollserum	1 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

LAGERUNG: Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 4 analytischen Testserien entworfen, wenn er tagsüber bei Raumtemperatur verwendet und nachtsüber bei 2-8°C aufbewahrt wird.

Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Flaschenetiketten angegeben.

*Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen.
Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!*

3.1. Beschichtete Röhrchen

Die Innenfläche jedes Röhrchens ist mit Antiserum gegen Testosteron (Kaninchen) beschichtet. Vor Gebrauch die Röhrchen in der ungeöffneten Dose auf Raumtemperatur bringen, um die Bildung von Kondenswasser auf der Oberfläche zu vermeiden. Nichtgebrauchte Röhrchen in der Dose lagern. Die Dose gut verschließen. Nie verschiedene Chargen beschichteter Röhrchen miteinander mischen.

3.2. ¹²⁵J-markiertes Testosteron (rot) (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 52 mL mit ¹²⁵J markiertes Testosteron, Rinderserumalbumin, Phosphat-Zitrat-Puffer, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die Radioaktivität beträgt max. 59 kBq (1,6 µCi) am Tag der Kalibration.

3.3. Testosteron-Kalibratoren (gebrauchsfertige Lösungen)

Jedes Fläschchen enthält Testosteron, steroidloses Serum und Konservierungsmittel. Die Konzentrationen der Kalibratoren sind: 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 ng/mL (0 - 0,87 - 1,73 - 3,47 - 8,7 - 17,3 - 34,7 nmol/L).

Der Inhalt des Nullkalibrators ist 1 mL in Humanserum. Der Inhalt der Kalibratoren 1-6 ist 0,5 mL in Neugeborenen-Rinderserum.

Da keine internationale Standard-Präparation gegenwärtig verfügbar ist, sind die Kit-Kalibratoren nach einer Innenreferenzpräparation kalibriert (99% Reinheit bei HPLC). Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.

3.4. Kontrollserum (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Testosteron, Humanserum und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens mit 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist eine Woche lang bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (50, 500 µL) (50 µL: Richtigkeit ± 3%, Präzision 2%; 500 µL: Richtigkeit ± 2%, Präzision 1%).
- Röhrchen-Ständer.
- Vortex-Mischer.
- Wasserbad mit Thermostat (37° ± 1°C).
- Absaugvorrichtung zum Absaugen der Inkubationsmischung.
- Gammacounter um das ¹²⁵J-Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es kann Humanserum oder -plasma verwendet werden. Die Antikoagulanten EDTA und Heparin wurden getestet und können in diesem Test benutzt werden. Blut aus der Vene entnehmen, koagulieren lassen, und das Serum so schnell wie möglich vom Koagulat trennen. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8°C aufbewahrt werden; andernfalls portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Werden Testosteron-Werte > 10 ng/mL erwartet, sind die Proben mit dem Nullkalibrator zu verdünnen.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Mindestens Doppelbestimmungen durchführen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede Proben-Serie durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen.

Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Reagenzien auf den Boden der beschichteten Röhrchen pipettieren. Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

Reagenzien \ Röhrchen	Kalibratoren 0-6	Proben
Kalibratoren	50 µL	–
Proben	–	50 µL
Tracer	500 µL	500 µL

- Mit dem Vortex-Mischer vorsichtig den Inhalt der Röhrchen **schütteln** und **3 Stunden bei 37°C inkubieren**.
- Vorsichtig die Inkubationsmischung **absaugen**. *Es ist zu überprüfen, ob die Flüssigkeit vollständig eliminiert ist, indem man sich versichert, dass die Absaug-Pipettenspitze den Boden der beschichteten Röhrchen berührt. Das Vorhandensein von Tröpfchen, die an die Wände der beschichteten Röhrchen heften, kann schwer reproduzierbare oder ungläubhafte Ergebnisse verursachen. Kein Farbstoff soll sichtbar sein.*
- Die **Radioaktivität** der Röhrchen **messen**.

7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/Bo%-Quotienten nach folgender Formel berechnen:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate von Kalibratoren oder Proben}}{\text{Mittlere Zählrate des Nullkalibrators}} \times 100$$

Auf linear-linearem oder halblogarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur Testosteron-Konzentration ausgedrückt in ng/mL oder nmol/L auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 1). Die Testosteron-Konzentrationen von jeder Probe, ausgedrückt in ng/mL oder nmol/L, direkt von der Kalibrationskurve ablesen. Werte verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Berechnungsbeispiel

Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.

Bezeichnung	cpm	B/Bo x 100
Nullkalibrator	10.559	100
0,25 ng/mL - 0,87 nmol/L	7.816	74,0
0,5 ng/mL - 1,73 nmol/L	6.999	66,3
1,0 ng/mL - 3,47 nmol/L	5.537	52,4
2,5 ng/mL - 8,7 nmol/L	4.184	39,6
5,0 ng/mL - 17,3 nmol/L	3.347	31,7
10,0 ng/mL - 34,7 nmol/L	2.350	22,3
Probe	5.376	50,9

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen Testosteron-Wert von 1,2 ng/mL (4,3 nmol/L) gefunden.

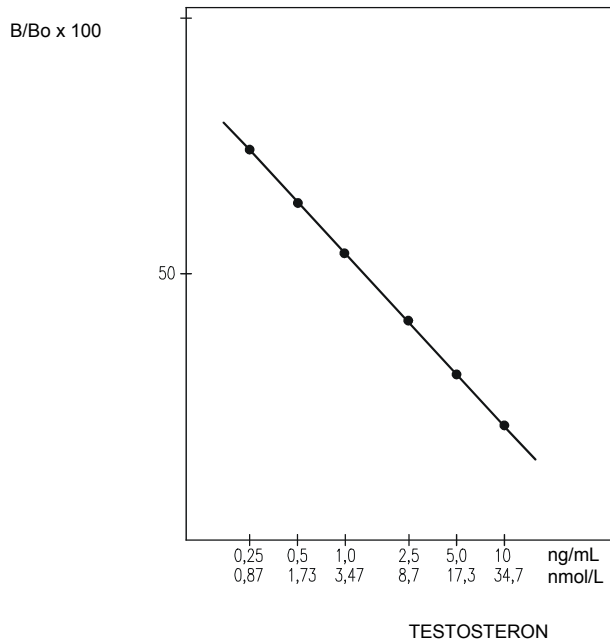


Abb. 1

8. ERWARTETE WERTE

Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte besitzen ausschließlich indikativen Charakter. Jedes Labor sollte eigene Referenzbereiche ermitteln.

Normale Männer	2,8 - 9,0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Normale Männer	0,1 - 1,0 ng/mL	0,3 - 3,5 nmol/L

Die Konversion in nmol Testosteron/L wird mit der folgenden Formel durchgeführt:
 $nmol\ Testosteron/L = ng\ Testosteron/mL \times 3,47.$

9. TESTMERKMALE

9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Antikoagulanten, Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung) oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

Interferenzen. Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Antikoagulanten (EDTA, Heparin), Hämolyse (bis 200 mg/dL Hämoglobin), Lipämie (bis 500 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 20 mg/dL Bilirubin). Testosteron-Werte, die mit Zitrat gewonnenen Plasmaproben erhalten werden, sind ungefähr um 30% niedriger als die Werte, die mit Serumproben erhalten werden.

Kreuzreaktionen. Die nach Abraham berechneten Kreuzreaktionen-Prozentsätze zeigen die Spezifität des verwendeten Antiserums.

- Testosteron	100%
- 5-Dihydrotestosteron	6,9%
- Androstendion	1,1%
- 19-Norethisteron	0,33%
- Danazol	0,15%
- Dihydroepiandrosteron	$4,5 \times 10^{-2}\%$
- 5 Alfa-Androstan, 3 Alfa, 17 Beta diol	$2,5 \times 10^{-2}\%$
- Testosteron Glukuronid	$2,0 \times 10^{-2}\%$
- Cortisol	} $< 1,0 \times 10^{-2}\%$
- Corticosteron	
- Cholesterin	
- Desoxycorticosteron	
- 17-Epitestosteron	
- Testosteron Sulfat	
- Androsteron	
- 3 Beta-Oxyandrostan, 5 Beta, 17 on	
- Progesteron	
- Östron	
- Östradiol, Äthynilöstradiol	
- Östriol	
- Dexamethason	

9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 0,02 ng/mL (0,07 nmol/L) bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen unter dem Nullkalibrator.

9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	14	14	14
Mittelwert (ng/mL)	1,13	3,61	7,27
Standardabweichung	0,091	0,158	0,262
Variationskoeffizient (%)	8,06	4,38	3,61

Vergleichpräzision	D	E	F	G
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10	10
Mittelwert (ng/mL)	0,419	2,164	4,650	9,342
Standardabweichung	0,032	0,135	0,339	0,661
Variationskoeffizient (%)	7,58	6,23	7,28	7,08

9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde mit Verdünnungs- und Wiederfindungstests geprüft.

Verdünnungstest. Es wurden zwei Proben mit hohen Testosteron-Konzentrationen nach serieller Verdünnung mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, ng/mL	Erhaltene Konzentration, ng/mL	% Wiederfindung
leer	–	5,38	–
1:2	2,69	2,60	96,7
1:4	1,34	1,30	96,7
1:8	0,67	0,67	99,7
1:16	0,34	0,34	101,2
1:32	0,17	0,18	107,1
leer	–	5,13	–
1:2	2,57	2,79	108,8
1:4	1,28	1,32	102,9
1:8	0,64	0,68	106,0
1:16	0,32	0,31	96,7
1:32	0,16	0,15	93,6

Wiederfindungstest. Zwei Proben mit niedriger Testosteron-Konzentration wurden als solche und nach Zugabe bekannter Mengen an Testosteron getestet.

Zugegebene Konzentration, ng/mL	Erwartete Konzentration, ng/mL	Erhaltene Konzentration, ng/mL	% Wiederfindung
–	–	0,30	–
3,88	4,18	4,10	98,1
2,46	2,76	2,50	90,6
1,11	1,41	1,50	106,4
0,69	0,99	1,00	101,0
0,39	0,69	0,70	101,4
–	–	4,84	–
3,88	8,72	8,90	102,1
2,46	7,30	7,40	101,4
1,11	5,95	6,40	107,6
0,69	5,53	5,70	103,1
0,39	5,23	5,30	101,3

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Diagnose darf nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen (> 25°C) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen der Röhrchen.
- Kontamination der Röhrchenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.

11. WARNUNGEN

Die Testkomponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Weil Natriumazid explosives Blei- oder Kupferazid in Rohrleitungen bilden kann, wird empfohlen, den Abfluss, nach dem Wegschütten von Substanzen, die Natriumazid enthalten, vollständig mit Wasser durchzuspülen (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R 31 – Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- S 28 – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit vielem Wasser.
- S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Natriummerthiolat (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 33 – Gefahr kumulativer Wirkungen.
- S 28 – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit vielem Wasser.
- S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 1,7 µCi (63 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

**TESTO-CTK
PIPETTIERSCHEMA**

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.

KALIBRATOREN, PROBEN	50 μ L
----------------------	------------



TRACER	500 μ L
--------	-------------



INKUBATION: 3 Std. BEI 37°C.



ABSAUGEN.



RADIOAKTIVITÄT DER RÖHRCHEN MESSEN.

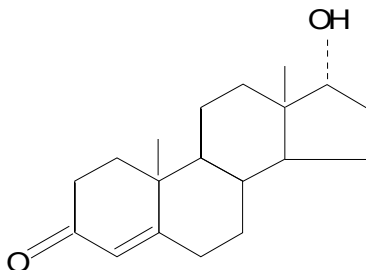
KIT PARA LA DETERMINACIÓN RADIOINMUNOLÓGICA DIRECTA DE LA TESTOSTERONA

Procedimiento para el análisis cuantitativo de la testosterona en muestras de suero o plasma humano

Sólo para uso in vitro

1. INTRODUCCIÓN

La testosterona, el principal andrógeno producido por las células de Leydig de los testículos, es una hormona esteroidea con un peso molecular de 288,4 daltons y con la siguiente fórmula química:



Aunque su síntesis se lleva a cabo principalmente en los testículos, la testosterona también se produce, en cantidades mucho más pequeñas, en la corteza suprarrenal y en los ovarios. Esto se debe al hecho de que cuando se sintetiza una hormona esteroidea se sigue una vía metabólica común.

Una globulina beta, denominada globulina ligada a la testosterona, transporta la testosterona a través del plasma. Se estima que aproximadamente el 97-99% de la testosterona circulante está ligada. El resto, presente como componente libre, se supone que es la parte metabólicamente activa del nivel total de testosterona.

Para llevar a cabo sus actividades biológicas, parece que la testosterona necesita convertirse en un metabolito activo más potente, la dihidrotestosterona, algo que puede ocurrir tanto en la circulación como en los tejidos blancos.

En la pubertad, las gonadotropinas hipofisarias aumentan estimulando la maduración testicular: la LH (hormona luteinizante) actúa directamente sobre los elementos mesenquimatosos intersticiales haciéndoles secretar testosterona y estrógenos a medida que se desarrollan hasta convertirse en células de Leydig maduras. La FSH (hormona foliculoestimulante) actúa sobre los túbulos para inducir y mantener la espermatogénesis normal.

Al comienzo de la pubertad, la testosterona estimula el desarrollo de las características del sexo masculino (tales como los genitales externos, los órganos sexuales auxiliares, el crecimiento de los pelos, el crecimiento lineal, el timbre de la voz, la psiche, la masa muscular y ósea) que se mantendrán a lo largo de toda la vida.

De acuerdo con las teorías, la edad en la que se han observado los niveles máximos de testosterona varía de los 15-20 a los 25 años. La testosterona se secreta de forma intermitente a lo largo del día, de forma que pueden observarse múltiples picos.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El principio del ensayo está basado en la competición entre testosterona marcada y testosterona contenida en los calibradores o en las muestras a analizar para un número fijo y limitado de sitios de enlace en los anticuerpos. Después de la incubación, la cantidad de testosterona marcada enlazada al anticuerpo fijado en las paredes de los tubos está inversamente relacionada con la concentración de testosterona no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre/enlazado está basado en el empleo de los tubos recubiertos de anticuerpos en los que el anticuerpo está fijado en las paredes de los tubos.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Tubos recubiertos	100
Testosterona marcada con ¹²⁵ I	1 vial
Calibradores de testosterona	7 vials
Suero de control	1 vial
Número de ensayos	100

MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada, conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 4 sesiones analíticas si se utiliza a lo largo del día a temperatura ambiente y si se conserva durante la noche a 2-8°C.

No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma. No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

3.1. Tubos recubiertos

La superficie interior de cada tubo está recubierta con antisuero anti-testosterona producido en conejos. En el momento del uso, ponga los tubos recubiertos a temperatura ambiente antes de abrir el contenedor, para evitar condensaciones de humedad. Los tubos no utilizados pueden ser conservados controlando que el contenedor esté bien cerrado. No mezcle lotes diferentes de tubos recubiertos.

3.2. Testosterona marcada con ¹²⁵I (roja): reactivo listo para el uso

El vial contiene 52 mL de testosterona marcada con ¹²⁵I, albúmina sérica bovina, tampón fosfato-citrato, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 59 kBq (1,6 µCi) en la fecha de calibración.

3.3. Calibradores de testosterona: reactivo listo para el uso

Cada vial contiene suero sin esteroides, conservantes y testosterona en las siguientes concentraciones: 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 ng/mL (0 - 0,87 - 1,73 - 3,47 - 8,7 - 17,3 - 34,7 nmol/L). El vial de calibrador cero contiene 1 mL de suero humano; los viales de los calibradores 1-6 contienen 0,5 mL de suero de ternero recién nacido.

Los calibradores del kit están calibrados contra una preparación interior de referencia (pura al 99% en HPLC, cromatografía líquida de alta resolución), porque actualmente no hay un estándar internacional disponible. Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.

3.4. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene testosterona, suero humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante una semana a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Micropipetas con puntas desechables de 50 μL (veracidad $\pm 3\%$, precisión 2%) y 500 μL (veracidad $\pm 2\%$, precisión 1%).
- Gradillas para tubos.
- Agitador Vórtex.
- Baño termostático para mantener $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$.
- Sistema para aspirar la mezcla de incubación.
- Contador gamma para contar el yodo ^{125}I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se pueden utilizar anticoagulantes como el EDTA y la heparina. Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

Si se prevén niveles de testosterona mayores de 10 ng/mL, diluya con el calibrador cero.

6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen.

Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Distribuya los reactivos *en el fondo de los tubos recubiertos*. Actúe según el siguiente esquema:

reactivos	tubos	Calibradores 0-6	Muestras
Calibrators		50 μL	–
Samples		–	50 μL
Tracer		500 μL	500 μL

- **Agite** el contenido de los tubos en el Vórtex e **incube durante 3 horas a 37°C** .
- **Aspire** cuidadosamente la mezcla de incubación. *Verifique que el líquido sea eliminado completamente, controlando que la punta de la pipeta de aspiración toque el fondo de los tubos recubiertos. La presencia de gotas adherentes a las paredes de los tubos recubiertos puede provocar baja reproducibilidad o resultados no fiables. No debe quedar traza del colorante rojo.*
- **Mida la radioactividad** de los tubos.

7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber abstraído el valor del fondo. Exprese la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje del cómputo medio del calibrador cero:

$$B/B_0\% = \frac{\text{cómputo medio de calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio del calibrador cero}} \times 100$$

Indique en un gráfico lineal-lineal o semilog el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de testosterona expresada en ng/mL o nmol/L en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 1). Lea directamente de la curva de calibración la concentración de testosterona de cada muestra expresada en ng/mL o nmol/L. Si la muestra ha sido diluida, la concentración de testosterona encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución.

Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/Bo x 100
Calibrador cero	10.559	100
0,25 ng/mL - 0,87 nmol/L	7.816	74,0
0,5 ng/mL - 1,73 nmol/L	6.999	66,3
1,0 ng/mL - 3,47 nmol/L	5.537	52,4
2,5 ng/mL - 8,7 nmol/L	4.184	39,6
5,0 ng/mL - 17,3 nmol/L	3.347	31,7
10,0 ng/mL - 34,7 nmol/L	2.350	22,3
Muestra	5.376	50,9

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 1,2 ng/mL (4,3 nmol/L) de testosterona.

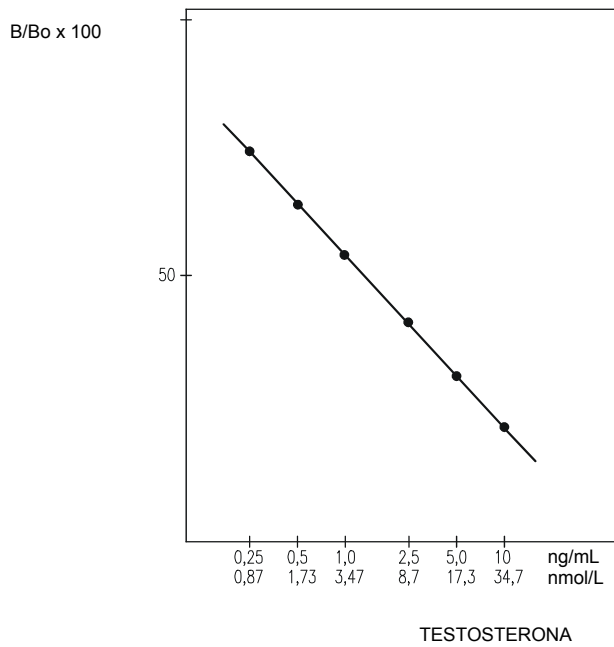


Fig. 1

8. DATOS CLÍNICOS

Los valores que se indican a continuación son exclusivamente indicativos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

Varones normales	2,8 - 9,0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Mujeres normales	0,1 - 1,0 ng/mL	0,3 - 3,5 nmol/L

La conversión en nmol de testosterona/L se obtiene con la siguiente fórmula:
 $\text{nmol testosterona/L} = \text{ng testosterona/mL} \times 3,47$.

9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra), o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por anticoagulantes (EDTA, heparina), hemólisis (hasta 200 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina). Los valores de testosterona hallados en las muestras de plasma obtenidas con citrato son aproximadamente un 30% inferior a los valores hallados en las muestras de suero.

Reacciones cruzadas. Los porcentajes de reacciones cruzadas, calculados según el método de Abraham, muestran la especificidad del antisuero usado.

- Testosterona	100%
- 5-dihidrotestosterona	6,9%
- Androstenodiona	1,1%
- 19-noretisterona	0,33%
- Danazol	0,15%
- Dehidroepiandrosterona	$4,5 \times 10^{-2}\%$
- 5 alfa-androstan, 3 alfa, 17 beta diol	$2,5 \times 10^{-2}\%$
- Glucoronato de testosterona	$2,0 \times 10^{-2}\%$
- Cortisol	} $< 1,0 \times 10^{-2}\%$
- Corticosterona	
- Colesterol	
- Desoxicorticosterona	
- 17-epitestosterona	
- Sulfato de testosterona	
- Androsterona	
- 3 beta-oxiandrostan, 5 beta, 17 ona	
- Progesterona	
- Estrona	
- Estradiol, etinilestradiol	
- Estriol	
- Dexametasona	

9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 0,02 ng/mL (0,07 nmol/L) al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por debajo de cero.

9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	14	14	14
Media (ng/mL)	1,13	3,61	7,27
Desviación estándar	0,091	0,158	0,262
Coefficiente de variación (%)	8,06	4,38	3,61

Reproducibilidad	D	E	F	G
Número de determinaciones	10	10	10	10
Media (ng/mL)	0,419	2,164	4,650	9,342
Desviación estándar	0,032	0,135	0,339	0,661
Coefficiente de variación (%)	7,58	6,23	7,28	7,08

9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante los test de dilución y de recuperación.

Test de dilución. Se han determinado diluciones en serie de dos sueros de concentración elevada de testosterona realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	% Recuperación
no diluido	–	5,38	–
1:2	2,69	2,60	96,7
1:4	1,34	1,30	96,7
1:8	0,67	0,67	99,7
1:16	0,34	0,34	101,2
1:32	0,17	0,18	107,1
no diluido	–	5,13	–
1:2	2,57	2,79	108,8
1:4	1,28	1,32	102,9
1:8	0,64	0,68	106,0
1:16	0,32	0,31	96,7
1:32	0,16	0,15	93,6

Test de recuperación. Se han determinado dos sueros que contengan bajos niveles de testosterona tanto no diluidos como después de la adición de cantidades crecientes de testosterona.

Concentración adicionada, ng/mL	Concentración esperada, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	% Recuperación
–	–	0,30	–
3,88	4,18	4,10	98,1
2,46	2,76	2,50	90,6
1,11	1,41	1,50	106,4
0,69	0,99	1,00	101,0
0,39	0,69	0,70	101,4
–	–	4,84	–
3,88	8,72	8,90	102,1
2,46	7,30	7,40	101,4
1,11	5,95	6,40	107,6
0,69	5,53	5,70	103,1
0,39	5,23	5,30	101,3

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración inadecuada de la mezcla de incubación
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los componentes del kit contienen azida sódica como conservante. Ya que, la azida sódica puede formar azidas de plomo o de cobre explosivas en las tuberías, se recomienda dejar fluir agua en abundancia en los desagües después de la eliminación de soluciones que contengan azida sódica (Directiva 99/45/CE del Consejo).

- R 22 – Nocivo por ingestión.
- R 31 – En contacto con ácidos libera gases tóxicos.
- S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.
- S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Mertiolato sódico (Council Directive 99/45/EC):

R 20/21/22 – Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 33 – Peligro de efectos acumulativos.

S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 1,7 μCi (63 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjugarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1 - RECONSTITUYA EL SUERO DE CONTROL.
- 2 - MARQUE LOS TUBOS RECUBIERTOS POR DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS \ TUBOS	CAL 0-6	MUESTRAS
CALIBRADORES	50 μ L	-
MUESTRAS	-	50 μ L
TRAZADOR	500 μ L	500 μ L

- 4 - INCUBE DURANTE 3 HORAS A 37°C.
- 5 - ASPIRE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN.
- 6 - MIDA LA RADIOACTIVIDAD DE LOS TUBOS.

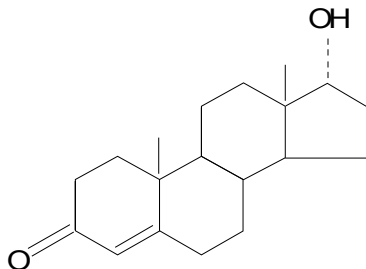
ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΕΣΗ ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Διαδικασία για την ποσοτική ανάλυση της τεστοστερόνης σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος

Μόνο για χρήση in vitro

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεστοστερόνη, το κύριο ανδρογόνο που παράγεται από τα κύτταρα του Leydig των όρχεων, είναι μια στεροειδής ορμόνη μοριακού βάρους 288,4 dalton, με τον ακόλουθο χημικό τύπο:



Παρότι συντίθεται κυρίως στους όρχεις, η τεστοστερόνη παράγεται - σε πολύ μικρές ποσότητες - και στον φλοιό των επινεφριδίων και στις ωθήκες. Αυτό συμβαίνει διότι η μεταβολική οδός που ακολουθείται για τη σύνθεση οποιασδήποτε στεροειδούς ορμόνης είναι κατά κάποιο τρόπο κοινή με εκείνη των άλλων στεροειδών ορμονών.

Η τεστοστερόνη μεταφέρεται στο πλάσμα από μία β-σφαιρίνη, στην οποία έχει δοθεί η ονομασία testosterone-binding globulin (σφαιρίνη σύνδεσης της τεστοστερόνης). Πιστεύεται ότι περίπου το 97-99% της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης είναι συνδεδεμένο. Το υπόλοιπο, το οποίο υπάρχει σαν ελεύθερο συστατικό, θεωρείται ως το μεταβολικά ενεργό μέρος της συνολικής τεστοστερόνης.

Για να εξαχθεί η βιολογική της δραστηριότητα, η τεστοστερόνη φαίνεται ότι πρέπει να μετατραπεί σε έναν ενεργό και πολύ πιο ισχυρό μεταβολίτη, την διυδροτεστοστερόνη. Αυτή η μετατροπή πραγματοποιείται τόσο στην κυκλοφορία όσο και στους ιστούς στόχους.

Κατά την εφηβεία οι γοναδοτροπίνες της υπόφυσης αυξάνονται, διεγείροντας την ωρίμανση των όρχεων: Η LH δρά άμεσα στα μεσενυχματικά ενδιάμεσα στοιχεία που εξελίσσονται σε ώριμα κύτταρα του Leydig και εκκρίνουν τεστοστερόνη και οιστρογόνα. Η FSH δρά στους γεννητικούς σωλήνες προκαλώντας και διατηρώντας τη φυσιολογική σπερματογένεση.

Στην αρχή της εφηβείας, η τεστοστερόνη διεγείρει την ανάπτυξη των ανδρικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών (όπως εξωτερικά γεννητικά όργανα, δευτερεύοντα γεννητικά όργανα, γραμμική ανάπτυξη, ανάπτυξη των τριχών, χροιά της φωνής, ψυχολογία και μάζα του μυϊκού και οστικού ιστού) που θα διατηρηθούν για ολόκληρη τη διάρκεια της ζωής.

Η ηλικία στην οποία παρατηρούνται τα μέγιστα επίπεδα τεστοστερόνης ποικίλλει από τα 15-20 μέχρι τα 25 χρόνια σύμφωνα με τις θεωρίες. Η τεστοστερόνη εκκρίνεται αποσπασματικά κατά τη διάρκεια της ημέρας κατά τρόπο που μπορούν να παρατηρηθούν πολλαπλά απόγεια.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η αρχή της δοσομέτρησης συνίσταται στον ανταγωνισμό ανάμεσα στην ιχνηθετημένη τεστοστερόνη και στην τεστοστερόνη που περιέχεται στους βαθμονομητές ή στα δείγματα για το σταθερό και περιορισμένο αριθμό θέσεων των αντισωμάτων. Έπειτα από την επώαση, η ποσότητα της ιχνηθετημένης τεστοστερόνης που έχει δημιουργήσει δεσμό με το συνδεδεμένο αντίσωμα στους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της μη ιχνηθετημένης τεστοστερόνης που υπάρχει στους βαθμονομητές ή στα δείγματα. Η μέθοδος που υιοθετείται για το διαχωρισμό ελεύθερης/συνδεδεμένης βασίζεται στη χρήση των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων, όπου το αντίσωμα έχει συνδεθεί στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες	100
Ιχνηθετημένη τεστοστερόνη με ¹²⁵ I	1 φιαλίδιο
Βαθμονομητές τεστοστερόνης	7 φιαλίδια
Ορός ελέγχου	1 φιαλίδιο
Αριθμός δοσομετρήσεων	100

ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ: Κατά τη στιγμή της άφιξης, διατηρήστε τα κιτ στους 2-8°C. Μην καταψύχετε. Έπειτα από το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια αυτού του κιτ είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξεως εάν διατηρηθούν καταλλήλως. Το κιτ είναι εγγυημένο για 4 σειρές ανάλυσης εάν χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ημέρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εάν διατηρείται στους 2-8°C κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέραν της ημερομηνίας λήξεως. Η ημερομηνία λήξεως του κιτ φαίνεται στην εξωτερική ετικέτα και ανταποκρίνεται στην ημερομηνία λήξεως του ιχνηθέτη. Η ημερομηνία λήξεως καθενός συστατικού φαίνεται στις ετικέτες των αντίστοιχων φιαλιδίων.

Κατά την ανασύσταση των φιαλιδίων, ανακινήστε απαλά ώστε να αποφύγετε τη δημιουργία αφρού. Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες.

3.1. Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες

Η εσωτερική επιφάνεια κάθε δοκιμαστικού σωλήνα έχει επενδυθεί με αντιορό αντι-τεστοστερόνης από κουνέλι. Τη στιγμή της χρήσης, φέρατε τους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν να ανοίξετε το δοχείο, ώστε να αποφύγετε συμπύκνωση της υγρασίας. Οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να διατηρούνται στο καλά κλειστό δοχείο. Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων.

3.2. Ιχνηθετημένη τεστοστερόνη με ¹²⁵I (κόκκινο): αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 52 mL τεστοστερόνης ιχνηθετημένης με ¹²⁵I, βόεια αλβουμίνη ορού, φωσφορικό-κιτρικό ρυθμιστικό, συντηρητικά και μια αδρανή κόκκινη χρωστική. Η μέγιστη ραδιενέργεια είναι 59 kBq (1,6 μCi) κατά την ημερομηνία της βαθμονόμησης.

3.3. Βαθμονομητές τεστοστερόνης: αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Κάθε φιαλίδιο περιέχει τεστοστερόνη, ορό χωρίς στεροειδή και συντηρητικά. Οι συγκεντρώσεις είναι οι ακόλουθες: 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 ng/mL (0 - 0,87 - 1,73 - 3,47 - 8,7 - 17,3 - 34,7 nmol/L).

Ο όγκος του μηδενικού βαθμονομητή είναι 1 mL σε ανθρώπινο ορό. Ο όγκος των βαθμονομητών 1-6 είναι 0,5 mL σε περιγεννητικό βόειο ορό.

Από τη στιγμή που δεν είναι διαθέσιμο επί του παρόντος ένα διεθνές πρότυπο, οι βαθμονομητές του κιτ έχουν βαθμονομηθεί έναντι ενός εσωτερικού παρασκευάσματος αναφοράς (καθαρό στο 99% σε HPLC). Οι έλεγχοι του κιτ εναλλάσσονται με τα δείγματα υπό εξέταση όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και την επιχειρησιακή διαδικασία του αντίστοιχου διαγνωστικού τεστ *in vitro*, σύμφωνα με όσα συνιστώνται από τον κατασκευαστή.

3.4. Ορός ελέγχου : λυόφιλο αντιδραστήριο

Το φιαλίδιο περιέχει τεστοστερόνη, ανθρώπινο ορό και συντηρητικά. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου με 1 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό για μία εβδομάδα στους 2-8°C. Διατηρήστε σε κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μια πιο μακρά συντήρηση.

4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Απεσταγμένο και αποϊονισμένο νερό.
- Μικρομετρικές σύριγγες με άκρα μίας χρήσεως των 50 μL (ακρίβεια ± 3%, επαναληπτικότητα 2%) και 500 μL (ακρίβεια ± 2%, επαναληπτικότητα 1%).
- Έδρανα δοκιμαστικών σωλήνων.
- Αναδευτήρας Vortex.
- Θερμοστατικό σύστημα σε θέση να διατηρεί 37° ± 1°C.
- Σύστημα για την αναρρόφηση του μίγματος επώασης.

- Μετρητής γάμμα για τη μέτρηση του Ιωδίου ¹²⁵I (ρύθμιση παραμέτρων του παραθύρου του μετρητή: 15-80 keV - απόδοση του μετρητή: 70% - χρόνος μέτρησης: 1 min). Εάν η απόδοση του μετρητή είναι κατώτερη του 60%, πρέπει να παραταθεί ο χρόνος μέτρησης σε 2 min.

5. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η δοσομέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά όπως το EDTA και η ηπαρίνη. Πραγματοποιήστε την αιμοληψία από φλέβα, αφήστε το αίμα να πήξει και διαχωρήστε τον ορό από το θρόμβο το συντομότερο δυνατόν. Καθαρίστε με φίλτράρισμα ή φυγοκέντριση πριν από το τεστ τα δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση, λευκαύγεια, λιπαιμία ή ερυθροκυτταρικά υπόλοιπα. Μη χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί ισχυρή αιμόλυση ή λιπαιμικά, ούτε επίσης και δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση ή προφανή μόλυνση από μικρόβια. Εάν η δοσομέτρηση έχει εκτελεσθεί στις επόμενες 24 ώρες από την ανάληψη, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8°C. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να διαιρεθούν σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Εάν τα δείγματα έχουν καταψυχθεί, ανακινήστε με προσοχή πριν να τα δοσομετρήσετε. Αποφεύγετε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης και απόψυξης.

Εάν προβλέπονται επίπεδα τεστοστερόνης υψηλότερα από 10 pg/mL, αραιώστε με το βαθμονομητή μηδέν.

6. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Φέρατε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) πριν από τη δοσομέτρηση. Προβλέπετε τους προσδιορισμούς τουλάχιστον εις διπλούν. Εκτελέστε τον προσδιορισμό των βαθμονομητών για κάθε σειρά αναλυμένων δειγμάτων. Η επιχειρησιακή μέθοδος πρέπει να είναι αυστηρά όμοια για τους βαθμονομητές και για τα δείγματα υπό εξέταση.

Εκτελέστε τις φάσεις της δοσομέτρησης με την προβλεπόμενη σειρά, χωρίς διακοπές.

Χρησιμοποιήστε μια νέα άκρη μίας χρήσεως για να απαλλάξετε τους βαθμονομητές και τα δείγματα.

- Διανήμετε τα αντιδραστήρια στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Ενεργήστε σύμφωνα με το ακόλουθο σχεδιάγραμμα:

δοκιμαστικοί σωλήνες	Βαθμονομητές 0-6	Δείγματα
αντιδραστήρια		
Βαθμονομητές	50 µL	–
Δείγματα	–	50 µL
Ιχνηθέτης	500 µL	500 µL

- **Ανακινήστε** το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων σε αναδευτήρα Vortex και **αφήστε για επώαση για 3 ώρες στους 37°C**.
- **Αναρροφήστε** επιμελώς το μίγμα επώασης. *Βεβαιωθείτε ότι η αποβολή του υγρού είναι πλήρης, όντας σίγουροι ότι η άκρη της μικροσύριγγας αναρρόφησης ακουμπά στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Η παρουσία σταγόνων που εφάπτονται στα τοιχώματα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων μπορεί να προκαλέσει μειωμένη αναπαραγωγικότητα ή μη έμπιστα αποτελέσματα. Δεν πρέπει να μείνει ίχνος της χρωστικής.*
- **Μετρήστε τη ραδιενέργεια** των δοκιμαστικών σωλήνων.

7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε το μέσο όρο των μετρήσεων για κάθε ομάδα δοκιμαστικών σωλήνων αφού έχετε αφαιρέσει την τιμή του ιζήματος. Εκφράστε το μέσο όρο των μετρήσεων βαθμονομητών και δειγμάτων ως εκατοστιαίο σε σχέση με το βαθμονομητή μηδέν:

$$B/B_0\% = \frac{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητών και δειγμάτων}}{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητή μηδέν}} \times 100$$

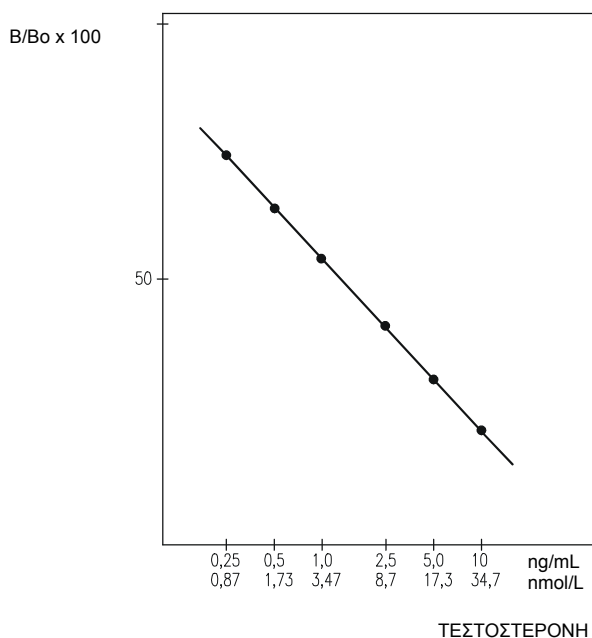
Φέρατε σε γραφικό διάγραμμα semi-log ή γραμμικό-γραμμικό τον εκατοστιαίο μέσο όρο που υπολογίστηκε για κάθε βαθμονομητή στον άξονα των τεταγμένων (άξονας των Y) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της τεστοστερόνης εκφρασμένη σε ng/mL ή nmol/L στο άξονα των τετημένων (άξονας των X). Επιτυγχάνεται έτσι μια καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 1). Απευθείας από την καμπύλη βαθμονόμησης διαβάστε τη συγκέντρωση της τεστοστερόνης κάθε ενός δείγματος εκφρασμένη σε ng/mL ή nmol/L. Εάν το δείγμα έχει αραιωθεί, η συγκέντρωση της τεστοστερόνης που θα βρεθεί πρέπει να είναι πολλαπλασιασμένη με το συντελεστή αραιώσεως.

Παράδειγμα υπολογισμού

Τα ακόλουθα στοιχεία πρέπει να θεωρηθούν μόνο ένα παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανάμεσα στα στοιχεία που θα προκύψουν στο χρήστη.

Περιγραφή	cpm	B/Bo x 100
Βαθμονομητής μηδέν	10.559	100
0,25 ng/mL - 0,87 nmol/L	7.816	74,0
0,5 ng/mL - 1,73 nmol/L	6.999	66,3
1,0 ng/mL - 3,47 nmol/L	5.537	52,4
2,5 ng/mL - 8,7 nmol/L	4.184	39,6
5,0 ng/mL - 17,3 nmol/L	3.347	31,7
10,0 ng/mL - 34,7 nmol/L	2.350	22,3
Δείγμα	5.376	50,9

Παρεμβάλλοντας από την καμπύλη βαθμονόμησης, το δείγμα προκύπτει να περιέχει 1,2 ng/mL (4,3 nmol/L) τεστοστερόνης.



Εικόνα 1

8. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι τιμές που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα είναι μονάχα ενδεικτικές. Συνιστούμε σε κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει τα δικά του διαστήματα αναφοράς.

Φυσιολογικοί άνδρες	2,8 - 9,0 ng/mL	10 - 30 nmol/L
Φυσιολογικές γυναίκες	0,1 - 1,0 ng/mL	0,3 - 3,5 nmol/L

Η μετατροπή σε nmol τεστοστερόνης/L εκτελείται με τον ακόλουθο τύπο:
 $\text{nmol τεστοστερόνης/L} = \text{ng τεστοστερόνης/mL} \times 3,47$.

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΙΤ

9.1. Ειδικότητα ανάλυσης

Η αναλυτική ειδικότητα ορίζεται σαν η ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει ακριβώς τον αναλύτη παρουσία παραγόντων δυνητικά παρεμβαλλόντων στο στέλεχος του δείγματος (για παράδειγμα, αντιπηκτικά, αιμόλυση, αποτελέσματα της επεξεργασίας του δείγματος) ή διασταυρούμενες αντιδράσεις με αναλύτες δυνητικώς παρεμβάλλοντες.

Παρεμβολές. Μελέτες που έχουν ελεγχθεί σχετικά με παράγοντες δυνητικώς παρεμβάλλοντες, έχουν αποδείξει το ότι οι επιδόσεις του τεστ δεν επηρεάζονται από αντιπηκτικά (EDTA, ηπαρίνη), αιμόλυση (μέχρι 200 mg/dL αιμοσφαιρίνης), λιπαιμία (μέχρι 500 mg/dL τριγλυκερίδια), χολερυθριναιμία (μέχρι 20 mg/dL χολερυθρίνης). Οι τιμές τεστοστερόνης που επιτυγχάνονται με τα δείγματα πλάσματος που περιέχουν κιτρικό προκύπτουν περίπου 30% κατώτερες από εκείνες που επιτυγχάνονται με τα δείγματα ορού.

Διασταυρούμενες αντιδράσεις. Τα εκατοστιαία ποσοστά διασταυρώμενων αντιδράσεων, που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με Abraham, επιδεικνύουν την ειδικότητα του χρησιμοποιούμενου αντιορού.

- Τεστοστερόνη	100%
- 5-διϋδροτεστοστερόνη	6,9%
- Ανδροστενδιόνη	1,1%
- 19- νορεθιστερόνη	0,33%
- Δαναζόλη	0,15%
- Δεϋδροεπιανδροστερόνη	$4,5 \times 10^{-2}\%$
- 5 άλφα-ανδροσταν, 3 άλφα, 17 βήτα διόλη	$2,5 \times 10^{-2}\%$
- Γλουκουρονική τεστοστερόνη	$2,0 \times 10^{-2}\%$
- Κορτιζόλη	} < $1,0 \times 10^{-2}\%$
- Κορτικοστερόνη	
- Χοληστερόλη	
- Δεσοξυκορτικοστερόνη	
- 17-επιτεστοστερόνη	
- Θεϊκή τεστοστερόνη	
- Ανδροστερόνη	
- 3 βήτα-οξυανδροσταν, 5 βήτα, 17 όνη	
- Προγεστερόνη	
- Οιστρόνη	
- Οιστραδιόλη, Αιθυλιοιστραδιόλη	
- Οιστριόλη	
- Δεξαμεθαζόνη	

9.2. Ευαισθησία ανάλυσης

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να εκφραστεί επίσης σαν όριο ανίχνευσης, ή η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που είναι ανιχνεύσιμη από το τεστ. Το όριο ανίχνευσης είναι 0,02 ng/ mL (0,07 nmol/L) στο 95% εμπιστοσύνης. Έχει υπολογισθεί σαν η φαινομενική συγκέντρωση του αναλύτη που διακρίνεται από τον βαθμονομητή μηδέν, ή δύο τυπικές αποκλίσεις κάτω από το μηδέν.

9.3. Επαναληπτικότητα

Η επαναληπτικότητα και η αναπαραγωγιμότητα του δείγματος (ή αλλιώς η δια-δειγματική και ενδο-δειγματική μεταβλητότητα) έχουν καθοριστεί χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύτη.

Επαναληπτικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	14	14	14
Μέσος όρος (ng/mL)	1,13	3,61	7,27
Τυπική απόκλιση	0,091	0,158	0,262
Βαθμός μεταβολής (%)	8,06	4,38	3,61

Αναπαραγωγικότητα	D	E	F	G
Αριθμός καθορισμών	10	10	10	10
Μέσος όρος (ng/mL)	0,419	2,164	4,650	9,342
Τυπική απόκλιση	0,032	0,135	0,339	0,661
Βαθμός μεταβολής (%)	7,58	6,23	7,28	7,08

9.4. Ακρίβεια

Η ακρίβεια της δοσομέτρησης έχει ελεγχθεί μέσω τεστ αραιώσης και ανάκτησης.

Τεστ αραιώσης. Έχουν δοσομετρηθεί μονόμετρες αραιώσεις δύο ορών σε υψηλή συγκέντρωση τεστοστερόνης πραγματοποιημένες στον μηδενικό βαθμονομητή.

Αραίωση	Συγκέντρωση αναμενόμενη, ng/mL	Συγκέντρωση μετρημένη, ng/mL	% Ανάκτησης
άθικτο	–	5,38	–
1:2	2,69	2,60	96,7
1:4	1,34	1,30	96,7
1:8	0,67	0,67	99,7
1:16	0,34	0,34	101,2
1:32	0,17	0,18	107,1
άθικτο	–	5,13	–
1:2	2,57	2,79	108,8
1:4	1,28	1,32	102,9
1:8	0,64	0,68	106,0
1:16	0,32	0,31	96,7
1:32	0,16	0,15	93,6

Τεστ ανάκτησης. Δοσομετρήθηκαν δύο οροί χαμηλής συγκέντρωσης τεστοστερόνης τόσο άθικτοι όσο και έπειτα από προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων τεστοστερόνης.

Συγκέντρωση προστιθέμενη, ng/mL	Συγκέντρωση αναμενόμενη, ng/mL	Συγκέντρωση μετρημένη, ng/mL	% Ανάκτησης
–	–	0,30	–
3,88	4,18	4,10	98,1
2,46	2,76	2,50	90,6
1,11	1,41	1,50	106,4
0,69	0,99	1,00	101,0
0,39	0,69	0,70	101,4
–	–	4,84	–
3,88	8,72	8,90	102,1
2,46	7,30	7,40	101,4
1,11	5,95	6,40	107,6
0,69	5,53	5,70	103,1
0,39	5,23	5,30	101,3

10. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η διάγνωση δεν θα πρέπει να διατυπώνεται με βάση το αποτέλεσμα μιας και μόνο δοσομέτρησης, αλλά αυτό θα πρέπει να αξιολογείται μαζί με άλλα κλινικά ευρήματα, διαγνωστικές διαδικασίες και υπό την κρίση του ιατρού.

Βακτηριακή μόλυνση ή επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων μπορούν να μετατρέψουν τα αποτελέσματα της δοσομέτρησης.

Για να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα χρειάζεται να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσεως και να κατέχεται μια κατάλληλη τεχνική χειρονομία. Ειδικότερα, είναι σημαντική μια καλή ακρίβεια στις φάσεις ανασύστασης, διανομής και αναρρόφησης των αντιδραστηρίων.

Αποτελέσματα που δεν επαναλαμβάνονται οφείλονται κυρίως σε μεθοδολογικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα:

- εναλλαγή στις κάψουλες ανάμεσα στα φιαλίδια
- χρήση του ίδιου άκρου μικροσύριγγας για τις αναλήψεις από διαφορετικά φιαλίδια ή από διαφορετικά δείγματα.
- φιαλίδια που έχουν αφεθεί ανοικτά για μακρές χρονικές περιόδους
- έκθεση των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων σε έντονη θερμότητα, ή σε ισχυρές πηγές βακτηριακής μόλυνσης.
- ακατάλληλη αναρρόφηση του μίγματος επώασης
- μόλυνση του άκρου των δοκιμαστικών σωλήνων με τον ιχνηθέτη ή με τα δείγματα
- τυχαίες διακυμάνσεις ή κακή συντήρηση του μετρητή γάμμα
- εναλλαγή των αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

11. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Τα συστατικά του kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Από τη στιγμή που το αζίδιο του νατρίου μπορεί να δημιουργήσει αζίδια μολύβδου ή χαλκού στις σωληνώσεις, συνίσταται να αφήσετε να τρέξει άφθονο νερό στις αποχετεύσεις έπειτα από την αποβολή διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Επιβλαβές κατά την κατάποση.
R 31 – Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται τοξικά αέρια.
S 28 – Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλυθείτε αμέσως με άφθονο νερό.
S 45 – Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείξτε την ετικέτα αν είναι δυνατό).

Sodium merthiolate (μερθειολικό νάτριο) (Council Directive 99/45/EC)

- R 20/21/22 – Επιβλαβές όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση καταπόσεως.
R 31 – Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται τοξικά αέρια.
R 33 – Κίνδυνος αθροιστικών επιδράσεων.
S 28 – Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλυθείτε αμέσως με άφθονο νερό.
S 45 – Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείξτε την ετικέτα αν είναι δυνατό).

Όλες οι μονάδες ορού και πλάσματος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των συστατικών αυτού του kit έχουν αναλυθεί και έχει βρεθεί ότι δεν έχουν καμία αντιδραστικότητα με HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 και anti-HIV-2. Παρόλα αυτά δεδομένου του ότι καμία μέθοδος δεν μπορεί να δώσει απόλυτη σιγουριά για το ότι απουσιάζουν παθογόνοι παράγοντες, όλο το υλικό ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να θεωρείται ως δυνητικώς μολυσματικό και επομένως θα πρέπει να τυχαίνει κατάλληλης μεταχείρισης.

12. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοσομέτρησης.
- Μην πραγματοποιείτε αναρρόφηση με το στόμα.
- Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα υλικά που ενδεχομένως να είναι μολυσμένα, φορώντας κατάλληλη ένδυση εργαστηρίου, προστατευτικά γυαλιά και γάντια μίας χρήσεως. Πλένετε προσεκτικά τα χέρια στο τέλος της δοσομέτρησης.
- Αποφεύγετε να προκαλείτε πιτσιλίσματα ή αεροζόλ. Κάθε σταγόνα βιολογικού αντιδραστηρίου πρέπει να αποβάλλεται με ένα διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% και το χρησιμοποιούμενο μέσο θα πρέπει να τυγχάνει μεταχείρισης κατάλληλης για μολυσμένα απόβλητα.
- Όλα τα δείγματα, όλα τα βιολογικά αντιδραστήρια του kit και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της δοσομέτρησης θα πρέπει να θεωρούνται ικανά να μεταδώσουν μολυσματικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό τα απόβλητα πρέπει να διατεθούν σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις και τους ισχύοντες κανονισμούς κάθε Κράτους. Τα υλικά μίας χρήσεως θα πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα υγρά απόβλητα θα πρέπει να απολυμαίνονται με υποχλωριώδες νάτριο σε μία τελική συγκέντρωση της τάξεως του 5% για τουλάχιστον μισή ώρα. Οποιοδήποτε υλικό που πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να τίθεται σε κλίβανο με μια προσέγγιση *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Γενικά θεωρείται ότι μία ώρα στους 121°C είναι

έναν επαρκή χρόνο αποστείρωσης. Παρ'όλα αυτά συνιστούμε σε κάθε χρήστη να επιβεβαιώνεται σχετικά με την αποτελεσματικότητα του κύκλου απολύμανσης μέσω μιας αρχικής επικύρωσης και την χρήση,σε βάση ρουτίνας, βιολογικών δεικτών.

13. ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΝΟΝΕΣ ΡΑΔΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Αντιδραστήρια που περιέχουν ιώδιο 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 1,7 μCi (63 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές in vitro που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

- 1 - ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΤΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.
- 2 - ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ ΤΟΥΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ.
- 3 - ΔΙΑΝΗΜΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΑΚΟΛΟΥΘΟ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΙΝΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ:

ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΙ ΣΩΛΗΝΕΣ	CAL 0-6	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ	50 μ L	-
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	-	50 μ L
ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ	500 μ L	500 μ L

- 4 - ΑΦΗΣΤΕ ΓΙΑ ΕΠΩΑΣΗ 3 ΩΡΕΣ ΣΤΟΥΣ 37°C
- 5 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ.
- 6 - ΜΕΤΡΗΣΤΕ ΤΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ.

REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

G.E. ABRAHAM, F.S. MANLIMOS, R. GARZA

Radioimmunoassay of steroids.

In: «Handbook of radioimmunoassay», G.E. Abraham ed., M. Dekker Inc., New York, p. 591 (1977).

F.J. AULETTA, B.V. CALDWELL, G.L. HAMILTON

Androgens: testosterone and dihydrotestosterone.

In: «Methods of hormone radioimmunoassay», B.M. Jaffe, H.R. Behrman eds., Academic Press, New York, p. 715 (1979).

C.W. BARDIN, C.A. PAULSEN

The testes

In: «Textbook of endocrinology», R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 293 (1981).

W.P. COLLINS et al.

Radioimmunoassay of plasma testosterone.

J. Steroid Biochem., **3** : 333 (1972).

D.C. CUMMING, S.R. WALL

Non-sex hormone-binding globulin-bound testosterone as a marker for hyperandrogenism.

J. Clin. Endocrinol. Metab., **61** (5) : 873 (1985).

P. DEWIS, D.C. ANDERSON

A practical approach to the hirsute patient.

Practitioner, **226** (2) : 223 (1982).

M.L. DUFAU et al.

Radioimmunoassay of plasma testosterone.

Clin. Chim. Acta, **37** : 109 (1972).

S. FURUYAMA, D.M. MAYES, C.A. NUGENT

A radioimmunoassay for plasma testosterone.

Steroids, **16** : 415 (1972).

S.P. GLICKMAN, R.L. ROSENFELD, R.M. BERGENSTAL, J. HELKE

Multiple androgenic abnormalities, including elevated free testosterone, in hyperprolactinemic women.

J. Clin. Endocrinol. Metab., **55** (2) : 251 (1982).

D.M. HALPIN, J.M. BURRIN, G.F. JOPLIN

Serum testosterone levels in women with Cushing's disease.

Acta Endocrinol., **122** (1) : 71 (1990).

A.A.A. ISMAIL, J.A. LORAINE

Testosterone.

In: «Hormone assays and their clinical application», J.A. Loraine, E.T. Bell eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 580 (1976).

W.W. LUTHOLD et al.

Serum testosterone fractions in women: normal and abnormal clinical states.

Metabolism, **42** (5) : 638 (1993).

E. NEACSU, L. SIMIONESCU, A. ZIMEL, A. CARAGHEORGHEOPOLO

The development of a radioimmunoassay system for testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT). Part 3: The preparation of radioiodinated testosterone.

Endocrinologie, **28** (3-4) : 127 (1990).

R.S. RITTMASER, D.M. ARAB, L. LEHMAN

Dose-response effect of depot leuprolide acetate on serum androgens in hirsute women.

Fertil. Steril., **65** (5) : 912 (1996).

G.L. ROYER et al.

Relationship between age and levels of total, free, and bound testosterone in healthy subjects.

Curr. Ther. Res., **35** (3) : 345 (1984).

E.A. RUCHHOFT, K.E. ELKIND-HIRSCH, R. MALINAK

Pituitary function is altered during the same cycle in women with polycystic ovary syndrome treated with continuous or cyclic oral contraceptives or a gonadotropin-releasing hormone agonist.

Fertil. Steril., **66** (1) : 54 (1996).

L. SIMIONESCU, E. NEACSU, A. ZIMEL, A. CARAGHEORGHEOPOL

The development of a radioimmunoassay system for testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT). Part 2: The preparation of antisera to testosterone.

Endocrinologie, **28** (3-4) : 107 (1990).

K.B. SINGH, D.K. MAHAJAN, J. WORTSMAN

Effect of obesity on the clinical and hormonal characteristics of the polycystic ovary syndrome.

J. Reprod. Med., **39** (10) : 805 (1994).



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.
Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

APM0136

34669 7/10