

Free Testosterone

CE

1. INTRODUCTION

La testostérone est une hormone stéroïdienne du groupe androgène. La testostérone est sécrétée dans les testicules et les ovaires bien que de petites quantités soient sécrétées dans les glandes adrénales. C'est l'hormone sexuelle masculine principale et un stéroïde anabolisant. Elle joue un rôle essentiel dans le bien-être et la santé chez l'homme et la femme.

En raison de son insolubilité dans les solutions aqueuses, pour la plupart la Testostérone circule dans le sang s'est liée pour transporter des protéines. Seul 1-2% des testostérone circulantes existent sous une forme non liée ou libre. La majorité, environ 60%, a une forte affinité avec le SHBG, alors que le reste est faiblement lié à l'albumine. L'albumine liée et les fractions libres peuvent être biologiquement actives, alors que le SHBG inhibe efficacement l'action de la testostérone.

Les effets de la testostérone peuvent être classés en tant qu'effets virilisants et anabolisants. Les effets anabolisants conduisent à l'augmentation de la masse musculaire et de la force, l'augmentation de la densité osseuse et de la résistance osseuse, l'augmentation linéaire de la stimulation et de la maturation des os. Les effets virilisants conduisent à la maturation des organes sexuels.

Chez les hommes, les niveaux de la testostérone diminuent graduellement avec l'âge.

La mesure de la fraction libre ou liée du sérum de la testostérone a été proposée comme un moyen d'estimation de l'hormone physiologique bioactive. Les niveaux de la testostérone libre sont élevés chez les femmes ayant un hyperandrogénisme associé à un hirsutisme en présence ou non de maladie des ovaires polykystiques. De plus, les mesures de la testostérone libre peuvent être plus utiles que la testostérone totale dans le cas où le SHBG est augmenté ou diminué (ex. Hypothyroïdisme et obésité).

2. INDICATION D'UTILISATION

La méthode colorimétrique immunoenzymatique compétitive est utilisée pour la détermination quantitative de la testostérone libre dans le sérum ou le plasma humain. Deuxième génération.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La testostérone présente dans le sang est liée à la SHBG (60%) et dans des quantités inférieures aux autres protéines (par exemple l'albumine). Seule la mesure de testostérone libre (< 1 % de testostérone totale) permet l'estimation de l'hormone biologiquement active.

Les puits de bandes de microdosage sont enduits d'anticorps anti-testostérone (phase solide). La testostérone dans l'échantillon rivalise avec la testostérone marquée à la peroxydase de raifort ajoutée (antigène marqué à l'enzyme) pour la liaison des anticorps. Après incubation, une séparation entre les produits liés et les anticorps libérés est effectuée par le rinçage de la phase solide. Le complexe immun formé par un antigène marqué à l'enzyme est observé par un ajout de substrat Tétraméthylbenzidine (TMB) qui conduit à un bleuissement du produit. L'intensité de ce produit est **inversement** proportionnelle à la quantité de testostérone dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG Anti-Testostérone** : 12 bandes détachables enduites anti-testostérone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
 - **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
 - **Conjugué à la Testostérone-HRP** : 1 flacon contenant 15 ml de Testostérone marqué à la peroxydase de raifort.
 - **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
 - **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois à 20 mM, NaCl 160 g/l, Tween-20 10 g/l, pH 7.4
 - **Contrôle A** : 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
 - **Contrôle B** : 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
 - **Etalons Testostérone** : 6 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0.0 pg/ml
Etalon 1:	0.2 pg/ml
Etalon 2:	1.0 pg/ml
Etalon 3:	4.0 pg/ml
Etalon 4:	20.0 pg/ml
Etalon 5:	100.0 pg/ml
- conversion d'unité: pmol/l = 3.47*pg/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37°C
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps anti-testostérone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué à la Testostérone-HRP

Solution de conjugué à la Testostérone-HRP prête à l'emploi.

6.3. Etalons de Testostérone

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations de testostérone libre suivantes :

Etalon 0:	0.0 pg/ml
Etalon 1:	0.2 pg/ml
Etalon 2:	1.0 pg/ml
Etalon 3:	4.0 pg/ml
Etalon 4:	20.0 pg/ml
Etalon 5:	100.0 pg/ml

Les solutions doivent être conservées entre 2°C et 8 °C.

Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.4. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10^{ème}. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôles

Les flacons contiennent 1 ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de plasma ou de sérum humain pour ces dosages doivent être prélevés sur des patients à jeun. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour contrôle A
2 puits	(ex. H2+A3)	Pour contrôle B

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37°C.

1. Pipeter 20 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : **L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.**

5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point de la courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les concentrations des sérums de la testostérone libre sont dans le tableau suivant :

	n° sera	Médiane pg/ml	Gamme pg/ml
mâle (âge)			
< 12	23	0,26	ND - 4,60
12 - 18	23	6,65	0,18 - 23,08
19 - 55	67	11,56	1,00 - 28,28
> 55	35	6,46	0,70 - 21,45
femelle (âge)			
< 12	20	ND	ND - 1,46
12 - 18	29	0,91	ND - 2,24
19 - 55	57	0,61	ND - 2,85
> 55	31	0,49	ND -1,56

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabricant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de testostérone libre pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. D'autres paramètres devant être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradations des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquat (x20) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation à l'intérieur d'un dosage est $\leq 8,9\%$.

Variation Inter Dosage

La variation entre les dosages a été déterminée par un répliquat (x10) sur trois sérums différents dans 10 dosages différentes. La variation entre les dosages est $\leq 12,4\%$.

11.2. Spécificité analytique

La spécificité est évaluée en mesurant la réponse apparente du dosage des potentielles réactivités croisées des analytes suivants et des substances interférentes (Anticoagulants). La réaction croisée des anticorps, calculées à 50% selon Abraham :

Analyte	% réaction croisée
DHT	0,08220%
ANDROSTENEDIONE	0,13200%
ANDROSTERONE	0,00005%
DHEA-S	< 0,00001%
CORTISON	< 0,00001%
CORTISOL	< 0,00001%
17 β -ESTRADIOL	0,00069%
ESTRONE	< 0,00001%
PREGNENOLONE	< 0,00001%
17 α -ETHINILESTRADIOL	0,00002%
NORGESTREL	0,00590%
DANAZOL	0,00327%
ALDOSTERONE	< 0,00001%
ESTRIOL	0,00009%
EPITESTOSTERONE	0,00001%
PROGESTERONE	< 0,00001%
17 OH-PROGESTERONE	0,00008%
DHEA	0,00003%
PREDNISON	< 0,00001%
SODIUM CITRATE	< 0,00001%
EDTA	< 0,00001%
HEPARIN	< 0,00001%

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de la testostérone libre par l'étalon 0 est 0.04 pg/ml.

11.4. Comparaison de méthode

La méthode ELISA de la testostérone libre a été comparée aux dosage RIA de testostérone libre de Siemens. 51 échantillons de sérum ont été analysés selon les deux systèmes d'essais.

La régression linéaire a été calculée :

$$Y = 1,81 \cdot X - 1,71$$

$$r^2 = 0,94$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Si vous utilisez l'équipement automatisé, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.

- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VHI et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Utiliser les Equipements de Protection Individuels (EPI) appropriés dans de l'utilisation des réactifs fournis.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300[®] comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Le TMB est un réactif irritant qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Eviter toute ingestion, inhalation, contact avec la peau ou les yeux.
- La solution stop est une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est un poison, corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau et les yeux pour éviter une brûlure chimique.
- Eviter l'exposition du réactif TMB/ H₂O₂ à la lumière du soleil, aux métaux et oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Cette méthode permet la détermination de la testostérone libre entre 0.2 pg/ml et 100.0 pg/ml.
- La signification clinique de la détermination de la testostérone libre peut ne pas être établie si le patient suit un traitement à la cortisone ou au stéroïdes naturels ou synthétiques.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit constant pour la reproductibilité. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse dans chaque plaque.
- L'ajout de TMB initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être ajoutée dans la manipulation pour éliminer toutes erreurs pendant la réaction.
- Suivre le mode d'emploi pour effectuer le contrôle qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et les sérums.
- Une grande précision est nécessaire pour la reconstitution et le dépôt des réactifs.
- Les échantillons contaminés microbiologiquement, hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés dans le dosage.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- Le kit ELISA de NovaTec est uniquement destiné à être utilisé par un personnel qualifié familiarisé avec les BPL.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV009

Free Testosterone (96 Déterminations)