

CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

STEROIDE
STEROIDS
STÉROÏDES
STERIODI
ESTEROIDES



Procedura per la determinazione LC-MS/MS

MassChrom[®]

**Steroidi
in siero/plasma**

Codice 72072

CE 

Parametri:

- Aldosterone
- Androstenedione
- Cortisolo
- Cortisone
- Corticosterone
- 11-Deossicorticosterone
- 11-Deossicortisolo
- 21-Deossicortisolo
- deidroepiandrosterone (DHEA)
- Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)
- Diidrotestosterone
- Estradiolo
- 17 α -Idrossiprogesterone
- Progesterone
- Testosterone

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH è certificata in accordo con la DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO 13485 e ISO 13485 CMDR. I nostri articoli vengono prodotti, confezionati e messi in circolazione in accordo alla direttiva europea 98/79/CE sui dispositivi medici per diagnostica in vitro.

© This document is protected by copyright. All rights reserved.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Germania

Tel.: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Indice.....	Pagina
1 Informazioni per l'ordine	4
2 Introduzione	7
2.1 Nozioni di base	7
2.2 Finalità applicative	10
2.3 Principio alla base del kit di reagenti.....	10
3 Sistema LC-MS/MS	11
3.1 Equipaggiamento e parametri del sistema LC-MS/MS.....	11
3.2 Misurazione MS/MS	13
3.3 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning)	13
3.4 Messa in esercizio	14
3.5 Messa a riposo temporanea	14
4 Transizioni di massa	14
5 Preparazione dei campioni	16
5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti	16
5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione.....	16
5.3 Ricostituzione dei controlli.....	17
5.4 Preparazione dei campioni	18
5.4.1 ... Preparazione dei campioni con piastre SPE a 96 pozzetti	18
5.4.2 ... Preparazione del campione con Sample Clean Up Columns	19
5.5 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati.....	19
5.6 Trattamento dei campioni al di fuori dell'intervallo lineare	20
6 Equipaggiamento aggiuntivo necessario	20
7 Acquisizione e valutazione dei dati	21
8 Controllo di qualità	21
9 Intervalli di riferimento.....	21
10 Fattori di conversione	28
11 Stoccaggio e stabilità dei reagenti.....	29
12 Smaltimento dei rifiuti	30
13 Esempi di cromatogrammi.....	31
14 Valutazione delle interferenze.....	32
15 Limitazioni cliniche	33
16 Risoluzione dei problemi.....	34
17 Bibliografia.....	35

Indice Pagina

Allegato I: Avvertenze sulle sostanze pericolose	36
Allegato II: Calcolo manuale.....	39
Allegato III: Dati relativi alle prestazioni	40
Allegato IV: Dichiarazione di conformità.....	47
Allegato V: Simboli.....	49

1 Informazioni per l'ordine

Codice	Prodotto	
72072/96	Kit di reagenti LC-MS/MS MassChrom® Steroidi in siero/plasma con piastre SPE a 96 pozzetti per steroidi	
	Contenuto per 96 determinazioni:	
	Mobile Phase A	1 x 900 ml
	Mobile Phase B	1 x 1000 ml
	Elution Buffer	2 x 50 ml
	Internal Standard Mix	1 x 5 ml
	Extraction Buffer	1 x 45 ml
	Reconstitution Buffer	1 x 10 ml
	Equilibration Reagent 1	1 x 80 ml
	Equilibration Reagent 2	1 x 80 ml
	Rinsing Solution	1 x 1000 ml
	Wash Buffer	2 x 70 ml
	Piastre di raccolta per steroidi	1 x 3 pezzi
	Piastre SPE a 96 pozzetti per steroidi	1 x 1 pezzo
	Pellicole adesive perforabili, per piastre SPE a 96 pozzetti	1 x 3 pezzi
72072/480	Kit di reagenti LC-MS/MS MassChrom® Steroidi in siero/plasma con piastre SPE a 96 pozzetti per steroidi	
	Contenuto per 480 analisi:	
	Mobile Phase A	4 x 900 ml
	Mobile Phase B	3 x 1000 ml
	Elution Buffer	5 x 50 ml
	Internal Standard Mix	5 x 5 ml
	Extraction Buffer	5 x 45 ml
	Reconstitution Buffer	5 x 10 ml
	Equilibration Reagent 1	5 x 80 ml
	Equilibration Reagent 2	5 x 80 ml
	Rinsing Solution	1 x 1000 ml
	Wash Buffer	10 x 70 ml
	Piastre di raccolta per steroidi	2 x 3 pezzi
	Piastre SPE a 96 pozzetti per steroidi	5 x 1 pezzo
	Pellicole adesive perforabili, per piastre SPE a 96 pozzetti	2 x 3 pezzi

72072/C

Kit di reagenti LC-MS/MS

MassChrom® Steroidi in siero/plasma
con Sample Clean Up Columns

Contenuto per 96 analisi:

Mobile Phase A	1 x 900 ml
Mobile Phase B	1 x 1000 ml
Elution Buffer	2 x 50 ml
Internal Standard Mix	1 x 5 ml
Extraction Buffer	1 x 45 ml
Reconstitution Buffer	1 x 10 ml
Equilibration Reagent 1	1 x 80 ml
Equilibration Reagent 2	1 x 80 ml
Rinsing Solution	1 x 1000 ml
Wash Buffer	2 x 70 ml
Sample Clean Up Columns	1 x 96 pezzi
Vials per autocampionatore, filettati, con micro inserto conico da 15 µl, vetro trasparente, 1,1 ml	1 x 100 pezzi
Tappo a vite in PP, setti in silicone/PTFE con intaglio, 1,0 mm	1 x 100 pezzi

Componenti ordinabili singolarmente:

72011	Mobile Phase A	900 ml
72002	Mobile Phase B	1000 ml
72033	Elution Buffer	50 ml
72044	Internal Standard Mix	5 ml
72005	Extraction Buffer	45 ml
72006	Reconstitution Buffer	10 ml
72077	Equilibration Reagent 1	80 ml
72008	Equilibration Reagent 2	80 ml
72009	Rinsing Solution	1000 ml
72012	Wash Buffer	70 ml
72055	Sample Clean Up Columns	96 pezzi
72056	Piastre di raccolta per steroidi	3 pezzi
72057	Piastre SPE a 96 pozzetti per steroidi	1 pezzo
72059	Pellicole adesive perforabili, per piastre SPE a 96 pozzetti	3 pezzi

Equipaggiamento:

72110	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
15070	Involucro prefiltro in acciaio	1 pezzo
15071	Prefiltro in acciaio, 0,5 µm	5 pezzi
J0602	Vials per autocampionatore, filettati, con micro inserto conico da 15 µl, vetro trasparente, 1,1 ml	100 pezzi
J0410	Tappo a vite in PP, setti in silicone/PTFE con intaglio, 1,0 mm	1 x 100 pezzi
33007	Provette per la preparazione del campione	50 pezzi
72058	Waste Plates	3 pezzi
72019	Tuning Mix MassChrom® Steroid Panel 1, Analytes and Internal Standards	1 x 1 ml
72020	Tuning Mix MassChrom® Steroid Panel 2, Analytes and Internal Standards	1 x 1 ml
72088	System Check Solution MassChrom® Steroid Panel 1	1 x 1 ml
72099	System Check Solution MassChrom® Steroid Panel 2	1 x 1 ml

Standard di calibrazione multilevel e controlli *MassCheck*® Chromsystems:

72038	6PLUS1 ® Multilevel Serum Calibrator Set	
	MassChrom ® Steroid Panel 1	7 x 3,0 ml (liof.)
72039	6PLUS1 ® Multilevel Serum Calibrator Set	
	MassChrom ® Steroid Panel 2	7 x 3,0 ml (liof.)
0341	MassCheck ® Steroid Panel 1 Serum Control Level I	5 x 3,0 ml (liof.)
0342	MassCheck ® Steroid Panel 1 Serum Control Level II	5 x 3,0 ml (liof.)
0343	MassCheck ® Steroid Panel 1 Serum Control Level III	5 x 3,0 ml (liof.)
0345	MassCheck ® Steroid Panel 2 Serum Control Level I	5 x 3,0 ml (liof.)
0346	MassCheck ® Steroid Panel 2 Serum Control Level II	5 x 3,0 ml (liof.)
0347	MassCheck ® Steroid Panel 2 Serum Control Level III	5 x 3,0 ml (liof.)

2 Introduzione

2.1 Nozioni di base

Il termine steroidi comprende una serie di sostanze rilevanti dal punto di vista biochimico, le cui strutture di base derivano dal colesterolo (sin. colesterina) (Fig.1) e che sono ugualmente diffuse in animali, piante e funghi. Di conseguenza la molecola di colesterina si trova anche nell'organismo umano, tra l'altro come precursore degli acidi biliari, delle lipoproteine e degli ormoni steroidei, dei quali fanno parte i messaggeri chimici della corteccia surrenale (gluco- e mineralcorticoidi) e gli ormoni sessuali prodotti dalle gonadi (androgeni e estrogeni). A questi ultimi appartiene anche il testosterone, i cui analoghi sintetici vengono assunti in maniera impropria come anabolizzanti per l'aumento della massa muscolare e il miglioramento del metabolismo osseo.

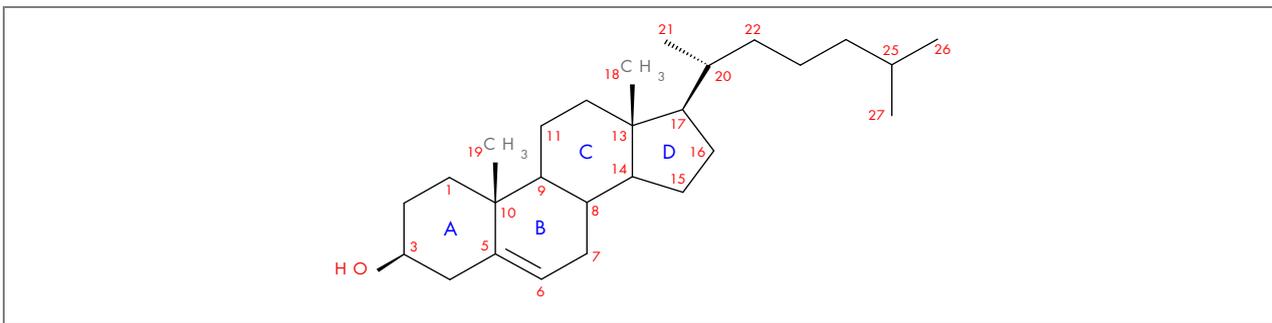


Figura 1: Struttura della molecola di colesterina

La molecola della colesterina è costituita da 27 atomi di carbonio e possiede la formula di base del ciclopentanoperidrofenantrene. La numerazione degli atomi di C di tutti gli steroidi segue quella del colesterolo.

La classificazione degli ormoni steroidei si basa sul numero degli atomi di carbonio che li costituiscono. Partendo dal colesterolo, che presenta una struttura di base con 27 atomi di C (Fig. 1), si formano, con l'accorciamento della catena laterale, il precursore di tutti gli ormoni steroidei, il pregnenolone con soli 21 atomi di carbonio, il cui numero si ritrova invariato negli ormoni surrenali, i mineral- e glucocorticoidi (Fig. 2).

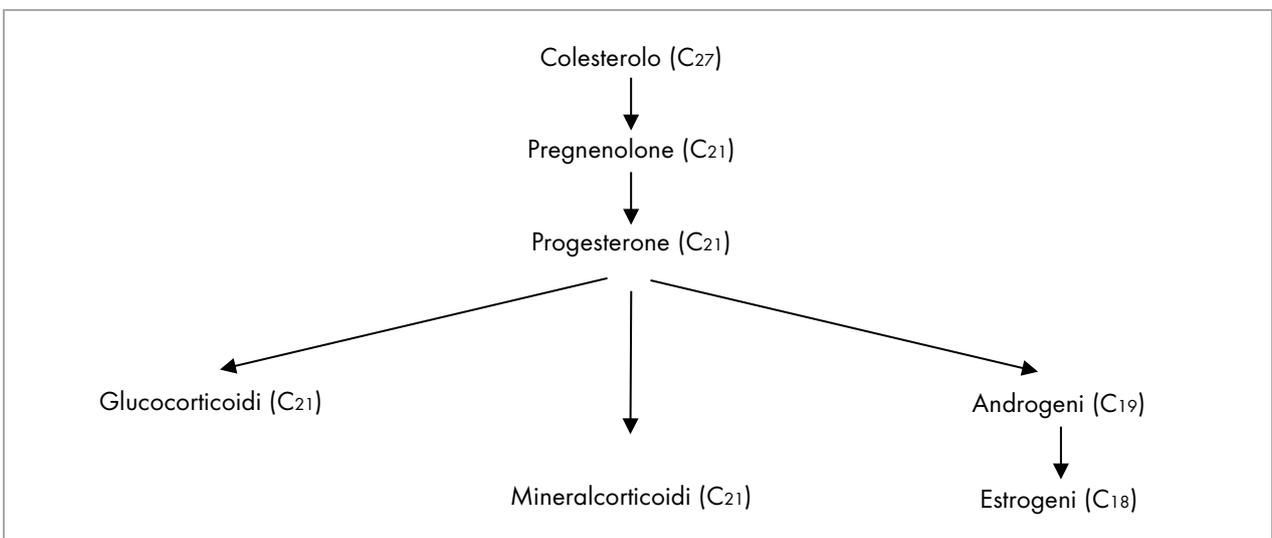


Figura 2: Panoramica della struttura del carbonio delle diverse classi di ormoni steroidei

Anche gli androgeni e gli estrogeni si formano attraverso la fase intermedia del pregnenolone. Il distacco ossidativo della catena laterale con la formazione di un gruppo chetonico sul C-17 produce la prima molecola con la struttura dell'androgeno, l'androstenedione, dalla quale si forma poi, attraverso la riduzione del gruppo chetonico in un gruppo idrossilico, il testosterone (Fig. 3). Entrambi presentano ora soltanto 19 atomi di C. A partire dall'androstenedione e dal testosterone si formano, per demetilazione nella posizione 19, gli estrogeni estrone e estradiolo, con la caratteristica struttura a 18 atomi di carbonio.

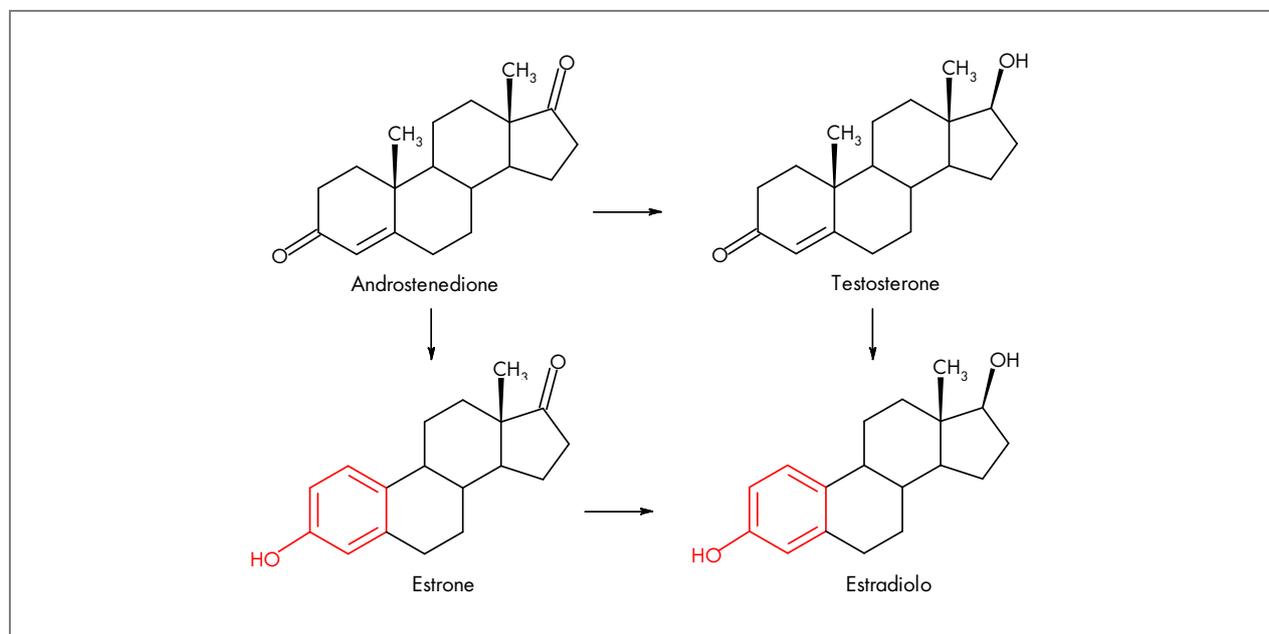


Figura 3: Via biosintetica della formazione di androgeni e estrogeni

La maggior parte degli ormoni steroidei si forma nella corteccia dei surreni, nelle gonadi e, in caso di gravidanza, anche nei tessuti placentari. Dopo la produzione vengono liberati nel circolo sanguigno. Legati alle proteine plasmatiche, raggiungono così le cellule di diversi organi target, dove si legano a recettori specifici, dando così il via a una cascata di specifiche trasmissioni di informazioni. In questo modo i trasmettitori grazie alla loro natura lipofila e al recettore specifico, arrivano nelle cellule, dove si diffondono raggiungendo il nucleo per dare inizio alla trascrizione di specifici segmenti di DNA, influenzando così in maniera mirata la fisiologia della cellula. Gli ormoni steroidei svolgono le seguenti funzioni vitali:

- Controllano e influenzano il metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine e mediano le reazioni di adattamento in presenza di stress (glucocorticoidi).
- I mineralcorticoidi svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento del bilancio idrico e elettrolitico.
- Estrogeni e progestinici sono responsabili della regolazione di quasi tutti i processi dell'organismo femminile che intervengono nella riproduzione
- Il testosterone, un androgeno, è responsabile soprattutto della formazione dei caratteri sessuali secondari maschili, che nelle donne sono controllati dagli estrogeni. Oltre all'aumento della massa muscolare e ossea e alla regolazione della crescita pilifera, il testosterone regola anche tutti i processi fisiologici che intervengono nella riproduzione nell'uomo.

Dati i numerosi processi che vengono controllati e regolati dagli ormoni steroidei, non vi è da stupirsi che i disturbi a carico della complessa biosintesi di questa classe di sostanze possa causare gravi compromissioni e disturbi nell'organismo e che provochino di conseguenza malattie anche gravi. Di seguito sono elencate alcune di queste patologie rilevanti.

- La **sindrome di Cushing** (ipercortisolismo), di cui esistono tre diverse varianti (I - III), viene provocata da un forte aumento della concentrazione di cortisolo nel sangue, che può essere la conseguenza di svariate malattie organiche. Tra le conseguenze a lungo termine si citano, tra l'altro, tipiche deformazioni di alcune parti del corpo, descritte per la prima volta dal neurologo Harvey Williams Cushing
- L'**iperaldosterismo** è caratterizzato fisiologicamente dalla produzione superiore alla media di aldosterone nei surreni. Le cause possono essere molteplici e come esempi si possono citare la formazione di adenomi così come di carcinomi, difetti genetici o iperplasie della corteccia surrenale
- Il concetto di **sindrome adrenogenitale** comprende una serie di malattie del metabolismo ereditarie autosomiche recessive, che provocano un disturbo della biosintesi degli ormoni steroidei nella corteccia surrenale. Il disturbo più frequente è un difetto dell'enzima 21-idrossilasi, più raramente è interessata la 11-β-idrossilasi. Ne consegue una carenza sia di cortisolo sia di aldosterone e questo calo della concentrazione delle due sostanze produce, tramite un meccanismo di feedback, una ulteriore e ancora più forte stimolazione della corteccia surrenale tramite l'ipotalamo e l'ipofisi. Per compensare, vengono immesse nelle vie di sintesi degli ormoni sessuali, anch'essi sintetizzati nella corteccia surrenale, quantità eccessive di prodotti intermedi del metabolismo, che nelle ragazze portano allo sviluppo di caratteri maschili e nei ragazzi allo sviluppo precoce. Inoltre, la carenza di aldosterone provoca disturbi del bilancio minerale connessi con la perdita di liquidi. Il trattamento consiste nella somministrazione degli ormoni mancanti.
- Il termine **ipogonadismo** indica i disturbi della funzione endocrina delle gonadi nell'uomo e nella donna. L'ipofunzione delle gonadi provoca in ultima istanza una carenza di ormoni sessuali (androgeni e estrogeni) che può provocare la riduzione, parziale o totale, della capacità riproduttiva. I caratteri sessuali primari e secondari possono regredire. E un ipogonadismo in età puberale può bloccare completamente questa importante fase dello sviluppo .
- La sindrome dell'**ovaio policistico** colpisce dal 4 al 12 % delle donne in età riproduttiva e rientra tra i disturbi endocrinologici femminili più frequenti. Molto spesso, in oltre il 50 % dei casi, le donne interessate soffrono di obesità. A seguito della malattia si verifica una iperandrogenemia dovuta all'aumento dei valori di testosterone e androstenedione e non di rado si osserva anche un aumento della concentrazione del deidroepiandrosterone solfato (DHEAS)
- Molti studi indicano inoltre che l'aumento della porosità ossea legato all'età, dopo i 60 anni, e il conseguente raddoppiamento del numero di fratture sono connessi anche alla riduzione dei livelli di testosterone nell'uomo. Come terapia si consiglia l'integrazione con testosterone.

La letteratura riporta molti altri esempi e la Tabella 1 (sotto) riassume i legami tra la fisiopatologia e l'ormone steroideo coinvolto.

Tabella 1: Ormoni steroidei e aspetti fisiopatologici connessi fisiopatologie connesse

Steroidi	Ormone steroideo	Fisiopatologia	Legame con
C-21 Steroidi	Glucocorticoidi	Sindrome di Cushing Sindrome di Addison	Cortisolo
	Mineralocorticoidi	Iperaldosterismo, Ipoaldosterismo	Aldosterone
C-19 Steroidi	Androgeni	Iperandrogenemia, Ipogonadismo, Sindrome adrenogenitale	Testosterone DHEAS, Androstenedione 17 α -idrossiprogesterone
C-18 Steroidi	Estrogeni	Insufficienza ovarica, sindrome dell'ovaio policistico, ipogonadismo, carcinoma	Estradiolo

2.2 Finalità applicative

Il kit di reagenti **MassChrom**[®] per l'analisi LC-MS/MS di steroidi in siero/plasma è un prodotto per la diagnosi *in vitro* destinato ai laboratori clinici e serve per la determinazione quantitativa mediante LC-MS/MS (cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa) di aldosterone, androstenedione, cortisolo, cortisone, corticosterone, 11-deossicorticosterone, 11-deossicortisolo, 21-deossicortisolo, deidroepiandrosterone (DHEA), diidroepiandrosterone solfato (DHEAS), diidrotosterone, estradiolo, 17 α -idrossiprogesterone, progesterone e testosterone come steroidi totali (somma degli steroidi liberi e legati) in campioni umani di siero e plasma. Il kit viene utilizzato come test in pazienti nei quali occorre tenere sotto controllo il livello dei suddetti ormoni steroidei.

2.3 Principio alla base del kit di reagenti

Il kit di reagenti Chromsystems **MassChrom**[®] Steroidi in siero/plasma (codice 72072) consente di svolgere in maniera affidabile la determinazione routinaria di 15 diversi ormoni steroidei mediante LC-MS/MS. Gli analiti sono divisi in due gruppi. Il primo gruppo, Steroid Panel 1, contiene gli analiti aldosterone, cortisolo, cortisone, corticosterone e 11- e 21-deossicortisolo. Il secondo gruppo, Steroid Panel 2, comprende gli analiti androstenedione, deidroepiandrosterone (DHEA), deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), 11-deossicorticosterone, diidrotosterone, estradiolo, 17-idrossiprogesterone, progesterone e testosterone.

La preparazione del campione è identica per entrambi i gruppi di steroidi. Per la maggior parte, gli steroidi sono legati a proteine. Aggiungendo lo Extraction Buffer questi legami vengono dissolti e quindi gli steroidi legati e liberi vengono determinati come steroidi totali. Segue una estrazione in fase solida ad alta efficienza in piastre SPE a 96 pozzetti oppure in colonnine SPE per analisi singole (Sample Clean Up Columns). Ogni analita è riferito a un proprio standard interno marcato con isotopi, che garantisce risultati quantitativi riproducibili e affidabili.

3 Sistema LC-MS/MS

Attenzione:

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato I.

3.1 Equipaggiamento e parametri del sistema LC-MS/MS

Per la determinazione LC-MS/MS di steroidi selezionati nelle matrici plasma e siero occorrono uno spettrometro di massa in tandem a triplo quadrupolo con sufficiente sensibilità, un sistema HPLC a gradiente (pressione di esercizio min. ammessa: 350 bar) con dispositivo di riscaldamento della colonna e un campionatore con dispositivo di raffreddamento.

Mantenere le fasi mobili chiuse o coperte anche durante il funzionamento. Quando si utilizzano piastre a 96 pozzetti, coprire gli eluati con l'apposita pellicola intagliata (codice 72059) nella piastra di raccolta (codice 72056). La separazione delle sostanze si effettua attraverso una colonna analitica (codice 72110).

Regolazioni dello strumento:

Volume d'iniezione:	5–50 µl (a seconda dello spettrometro di massa usato)
Durata dell'analisi:	Steroid-Panel 1: 10,0 min Steroid-Panel 2: 11,7 min
Temperatura colonna:	Steroid-Panel 1: +32 °C Steroid-Panel 2: +27 °C
Soluzione di lavaggio per l'ago iniettore:	Rinsing Solution (codice 72009)

Per definire il volume di iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti di 5 a 50 µl di uno standard di calibrazione 1 precedentemente preparato (codice 72038/1 o 72039/1) fino a ottenere la necessaria grandezza del picco e un rapporto segnale-rumore sufficiente. Quindi, verificare tramite le rette di calibrazione se tutti gli analiti producono una risposta lineare sull'intero intervallo di misurazione.

Composizione del gradiente

Il gradiente indicato va utilizzato solo come base da cui procedere all'ottimizzazione. Poiché i volumi morti variano da sistema a sistema, può essere eventualmente necessario adeguare la composizione del gradiente.

Tabella 2: Gradiente Panel 1

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	83 %	17 %	0,8 ml/min
2,00 min	83 %	17 %	0,8 ml/min
2,01 min	67 %	33 %	0,8 ml/min
3,40 min	67 %	33 %	0,8 ml/min
3,41 min	67 %	33 %	0,4 ml/min
4,70 min	67 %	33 %	0,4 ml/min
4,71 min	63 %	37 %	0,4 ml/min
6,20 min	63 %	37 %	0,4 ml/min
6,21 min	63 %	37 %	0,6 ml/min
8,00 min	63 %	37 %	0,6 ml/min
8,01 min	0 %	100 %	0,6 ml/min
9,00 min	0 %	100 %	0,6 ml/min
9,01 min	83 %	17 %	0,8 ml/min
10,0 min	83 %	17 %	0,8 ml/min

Tabella 3: Gradiente Panel 2

Tempo	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flusso
0,00 min	70 %	30 %	0,8 ml/min
1,00 min	70 %	30 %	0,8 ml/min
1,01 min	57 %	43 %	0,8 ml/min
3,70 min	57 %	43 %	0,8 ml/min
3,71 min	57 %	43 %	0,5 ml/min
4,20 min	57 %	43 %	0,5 ml/min
4,21 min	50 %	50 %	0,5 ml/min
6,00 min	50 %	50 %	0,5 ml/min
8,80 min	30 %	70 %	0,5 ml/min
8,81 min	30 %	70 %	0,8 ml/min
9,80 min	30 %	70 %	0,8 ml/min
9,81 min	0 %	100 %	0,8 ml/min
10,70 min	0 %	100 %	0,8 ml/min
10,71 min	70 %	30 %	0,8 ml/min
11,70 min	70 %	30 %	0,8 ml/min

Funzione di commutazione MS/Waste

Con la funzione opzionale MS/Waste dopo il passaggio nella colonna, la soluzione viene convogliata tramite una valvola nel contenitore dei rifiuti (waste). Modificare la posizione della valvola prima della eluzione degli analiti (MS/MS).

Tabella 4: Commutazione MS/Waste

Posizione valvola	Steroid Panel 1	Steroid Panel 2
Waste	0-2,5 min	0-1,5 min
MS/MS	2,5-9,8 min	1,5-11 min
Waste	9,8-10 min	11-11,7 min

3.2 Misurazione MS/MS

Fondamenti del metodo di misurazione

Lo spettrometro di massa analizza le molecole distinguendole in funzione del rapporto massa/carica (m/z). A tal fine gli analiti devono essere dapprima ionizzati e trasferiti nella fase gassosa. Il metodo di ionizzazione che si è dimostrato più versatile e semplice da utilizzare è l'ESI (ElectroSpray Ionisation).

In spettrometria di massa MS/MS a triplo quadrupolo si utilizzano varie modalità di misurazione. Il presente metodo utilizza esclusivamente il Multiple Reaction Monitoring.

Multiple Reaction Monitoring (MRM):

In modalità MRM, il primo e il secondo quadrupolo vengono impostati staticamente su uno specifico rapporto massa/carica (m/z). Nell'MS 1 viene discriminato lo ione molecolare dell'analita, mentre gli ioni con un altro rapporto massa/carica sono esclusi. Nella camera di collisione lo ione molecolare si frammenta e l'MS 2 rileva uno ione frammentato caratteristico. La modalità MRM offre una sensibilità e selettività di quantificazione particolarmente elevata.

3.3 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning)

Si raccomanda di verificare la precisione e la risoluzione del sistema MS/MS su misure di massa esatta. Nel caso in cui la precisione del sistema rispetto a misure di massa esatte e risoluzione si situino al di fuori delle specifiche del produttore dello strumento, si raccomanda una ri-calibrazione dello spettrometro di massa. Al termine, ottimizzare le transizioni MRM come segue:

1. diluire la Tuning Mix Steroid Panel 1 (codice 72019) con Mobile Phase A (codice 72011) come indicato per l'apparecchio in uso.
2. iniettare la Tuning Mix diluita o immetterla nel circuito con una pompa per infusione tramite un raccordo a T (50 % Mobile Phase A / 50 % Mobile Phase B a un flusso di 0,4 ml/min).
3. determinare con Q1 Scan (MS Scan) le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS1 (ioni genitore) almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.
4. determinare le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS2 (ioni figli) mediante scansione degli ioni prodotti almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.
5. ottimizzare i parametri specifici per ogni singola transizione MRM (ad es. energia di collisione).
6. in base alle transizioni MRM rilevate, ottimizzare i parametri globali della sorgente ionica, in particolare i voltaggi del capillare, la temperatura e i flussi dei diversi gas.

Al termine ripetere il processo con la Tuning Mix Steroid Panel 2 (codice 72020).

Per una corretta messa a punto dell'apparecchio, leggere accuratamente le istruzioni per l'uso del sistema LC-MS/MS installato. Per qualsiasi chiarimento, rivolgersi alla casa produttrice dell'apparecchio; eventualmente può essere necessario frequentare un corso di formazione della casa produttrice dell'apparecchio.

3.4 Messa in esercizio

Prima di cominciare la serie di analisi, preparare il sistema LC-MS/MS come segue:

1. equilibrare il sistema per 10 min. alle condizioni iniziali del metodo
2. iniettare più volte la System Check Solution del panel da analizzare (codice 72088 o 72099) fino a ottenere tempi di ritenzione e intensità di segnale degli analiti pressoché identici
3. avviare la sequenza di analisi.

Per un corretto uso del sistema LC-MS/MS seguire le istruzioni fornite con il sistema. In caso di dubbio, rivolgersi alla casa produttrice dell'apparecchio; può essere necessaria una formazione impartita dal fornitore.

3.5 Messa a riposo temporanea

In caso d'interruzioni temporanee si consiglia di spegnere la pompa HPLC: non si prevede una cristallizzazione di sali sulle guarnizioni dei pistoni della pompa. Per risparmiare la sorgente e il fotomoltiplicatore, impostare il sistema MS/MS in modalità standby. Lasciare in funzione le pompe a vuoto del sistema LC-MS/MS e spegnere il dispositivo di riscaldamento della colonna.

4 Transizioni di massa

La seguente tabella contiene le transizioni di massa MRM raccomandate per gli analiti e i relativi standard interni marcati con isotopi.

Tutte le transizioni di massa indicate (MRM 1 = Quantifier, restanti MRM = Qualifier) sono validate.

Tabella 5: Transizioni di massa raccomandate Steroid Panel 1 (Tuning Mix Steroid Panel 1, codice 72019)

Analita/ standard interno	Polarità ESI	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Aldosterone	negativa	359 → 331	359 → 189	—
Aldosterone-d ₄	negativa	363 → 335	363 → 190	—
Corticosterone	positiva	347 → 121	347 → 109	347 → 97
Corticosterone-d ₈	positiva	355 → 125	355 → 113	355 → 100
Cortisolo	positiva	363 → 97	363 → 121 364 → 121*	363 → 327
Cortisolo-d ₄	positiva	367 → 97	367 → 121 368 → 121*	367 → 331
Cortisone	positiva	361 → 163	361 → 121	361 → 105

Analita/ standard interno	Polarità ESI	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Cortisone-d ₃	positiva	369 → 168	369 → 124	369 → 107
11-Deossicortisolo	positiva	347 → 97	347 → 109	—
11-Deossicortisolo-d ₃	positiva	352 → 100	352 → 113	—
21-Deossicortisolo	positiva	347 → 121	347 → 109	347 → 97
21-Deossicortisolo-d ₃	positiva	355 → 125	355 → 113	355 → 100

* In caso di bassa linearità del rilevatore dello spettrometro, si raccomanda di misurare il cortisolo come *qualifier* tramite l'isotopo ¹³C

Tabella 6: Transizioni di massa raccomandate Steroidpanel 2 (Tuning Mix Steroid Panel 2, codice 72020)

Analita/ standard interno	Polarità ESI	MRM 1	MRM 2
Androstenedione	positiva	287 → 97	287 → 109
Androstenedione- ¹³ C ₃	positiva	290 → 112	290 → 100
Deidroepiandrosterone (DHEA)	positiva	289 → 213	271 → 213
Deidroepiandrosterone (DHEA)-d ₃	positiva	294 → 218	276 → 218
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	negativa	369 → 99 370 → 82*	369 → 82 370 → 99*
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)-d ₃	negativa	375 → 100 376 → 82*	375 → 82 376 → 100*
11-Deossicorticosterone	positiva	331 → 109	331 → 97
11-Deossicorticosterone-d ₃	positiva	339 → 113	339 → 100
Diidrotestosterone (DHT)	positiva	291 → 255	291 → 159
Diidrotestosterone (DHT)-d ₃	positiva	294 → 258	294 → 159
Estradiolo	positiva	255 → 159	255 → 133
Estradiolo-d ₃	positiva	260 → 161	260 → 135
17α-Ildrossiprogesterone	positiva	331 → 109	331 → 97
17α-Ildrossiprogesterone- ¹³ C ₃	positiva	334 → 112	334 → 100
Progesterone	positiva	315 → 97	315 → 109
Progesterone- ¹³ C ₃	positiva	318 → 100	318 → 112
Testosterone	positiva	289 → 97	289 → 109
Testosterone-d ₃	positiva	292 → 97	292 → 109

* In caso di bassa linearità del rilevatore dello spettrometro, si raccomanda di misurare DHEAS tramite l'isotopo ¹³C

Le masse nominali indicate vanno considerate solo come punti di partenza da cui procedere all'ottimizzazione. La posizione precisa delle masse esatte varia leggermente da sistema a sistema e deve essere determinata nell'ambito della messa a punto del metodo. Per l'allestimento del metodo si raccomanda di definire la posizione delle masse almeno fino a un decimale dopo la virgola. A tal fine utilizzare la corrispondente Tuning Mix (codice 72019 o 72020, v. Capitolo 3.3: Ottimizzazione delle transizioni MRM).

Per qualsiasi domanda riguardante l'allestimento del metodo per il sistema LC-MS/MS, rivolgersi alla nostra assistenza Chromsystems all'indirizzo support@chromsystems.com.

5 Preparazione dei campioni

Attenzione:

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato I.

5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti

L'analisi viene condotta su siero o plasma.

Non utilizzare provette di prelievo con gel separatori, perché alcuni gel adsorbono una parte degli analiti, distorcendo il risultato. Inoltre alcuni gel provocano picchi di disturbo, che tuttavia possono essere ampiamente separati per via cromatografica. In rari casi è stato osservato, utilizzando una provetta per prelievi con litio-eparina, un picco di disturbo non sufficientemente separato (v. Cap. 14 Verifica delle interferenze).

Gli analiti aldosterone, cortisolo, cortisone, corticosterone, 11-deossicortisolo, androstenedione, DHEAS, estradiolo, 17 α -idrossiprogesterone, progesterone e testosterone sono stabili a temperatura ambiente per un massimo di 1 giorno [1-3]. Per aldosterone e progesterone sono descritti anche tempi di conservazione ridotti o nulli a temperatura ambiente [3,4]. A +2 ... +8 °C gli steroidi sopraelencati si conservano per almeno 3 giorni [1-4]. Il DHEA è stabile per 4 giorni sia a temperatura ambiente sia in frigorifero (a +2 ... +8 °C) [5]. Al momento non esistono dati sulla stabilità del 11-deossicorticosterone, del 21-deossicortisolo e del diidrotestosterone.

Avviso:

Rientra nelle responsabilità di ogni laboratorio ricorrere a tutto il materiale di riferimento disponibile e/o svolgere studi propri per definire i criteri di stabilità specifici per il proprio laboratorio.

5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione

Prima di procedere alla preparazione dei campioni, ricostituire gli standard di calibrazione di siero (codice 72038 e 72039) come segue:

1. pipettare 3,0 ml di acqua distillata nel flacone originale
2. ricostituire per 10-15 min. a +20...+25 °C, agitando più volte

Verificare che il contenuto del flacone sia omogeneo. Se sono ancora visibili sostanze non disciolte, prolungare il tempo di ricostituzione.

I valori di calibrazione sono riconducibili a pesate iniziali di sostanze pure. Le concentrazioni degli analiti nello standard di calibrazione variano da lotto a lotto. I valori specifici sono indicati nel foglietto illustrativo dello standard di calibrazione.

Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano sierico che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

Stabilità degli standard di calibrazione dopo la ricostituzione

Gli standard di calibrazione disciolti in acqua hanno i seguenti periodi di stoccaggio:

Tabella 7: Stabilità degli standard di calibrazione dopo la ricostituzione

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+20...+25 °C	3 giorni	al riparo dalla luce, ben chiuso
+2...+8 °C	10 giorni	al riparo dalla luce, ben chiuso
inferiore a -18 °C	3 mesi	al riparo dalla luce, ben chiuso

5.3 Ricostituzione dei controlli

Prima della preparazione dei campioni ricostituire i controlli di siero (codice 0341, 0342, 0343, 0345, 0346, 0347) come segue:

1. pipettare 3,0 ml di acqua distillata nel flacone originale
2. ricostituire per 10-15 min. a +20...+25 °C, agitando più volte

Verificare che il contenuto del flacone sia omogeneo. Se sono ancora visibili sostanze non disciolte, prolungare il tempo di ricostituzione.

Le concentrazioni degli analiti nei controlli variano da lotto a lotto. I valori specifici sono indicati nel foglietto illustrativo del relativo controllo.

Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano sierico che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

Stabilità dei controlli dopo la ricostituzione:

I controlli disciolti in acqua hanno i seguenti periodi di stoccaggio:

Tabella 8: Stabilità dei controlli dopo la ricostituzione

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+20...+25 °C	3 giorni	al riparo dalla luce, ben chiuso
+2...+8 °C	10 giorni	al riparo dalla luce, ben chiuso
inferiore a -18 °C	3 mesi	al riparo dalla luce, ben chiuso

5.4 Preparazione dei campioni

5.4.1 Preparazione dei campioni con piastre SPE a 96 pozzetti

Per preparare campioni di pazienti, controlli e standard di calibrazione eseguire le seguenti operazioni nella successione indicata:

Equilibratura della piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi

1. Collocare la piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi sulla Waste Plate
2. Collocare 0,8 ml di Equilibration Reagent 1 in ciascun pozzetto della piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi
3. Centrifugare per 1 min a 400 x g, verificare che l'eluizione sia completa, eliminare l'eluato
4. Ripetere i passi 2 e 3 con 0,8 ml di Equilibration Reagent 2

Preparazione del campione con piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi

5. Collocare in ciascun pozzetto della piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi 500 µl di campione/standard di calibrazione/controllo ben omogeneizzato
6. Aggiungere in ciascun pozzetto 50 µl di Internal Standard Mix e 450 µl di Extraction Buffer
7. Agitare la piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi per 2 min. a 600 U/min.
8. Centrifugare per 1 min. a 400 x g, verificare che l'eluizione sia completa, eliminare l'eluato
9. Aggiungere 0,7 ml di Wash Buffer e centrifugare per 1 min a 400 x g, eliminare l'eluato
10. Aggiungere 0,7 ml di Wash Buffer e centrifugare a secco per 2 min bei 3000 x g, eliminare l'eluato
11. Collocare la piastra SPE a 96 pozzetti per steroidi sulla piastra di raccolta
12. Aggiungere in ciascun pozzetto 500 µl di Elution Buffer e centrifugare per 1 min. a 400 x g

Concentrazione e iniezione

13. Evaporare l'eluato nella piastra di raccolta utilizzando una corrente di azoto/aria compressa a 50 °C fino all'essiccazione (si veda anche il cap. 6: Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit)
14. Collocare in ciascun pozzetto 100 µl di Reconstitution Buffer nelle cavità della piastra di raccolta
15. Agitare la piastra di raccolta per 2 min. a 900 giri/min.
16. Coprire la piastra di raccolta con una pellicola e trasferirla all'autosampler
17. Iniettare 5-50 µl di eluato nel sistema LC-MS/MS

Per le avvertenze sulla determinazione del volume d'iniezione ottimale consultare il Capitolo 3.1.

5.4.2 Preparazione del campione con Sample Clean Up Columns

Per preparare campioni di pazienti, controlli e standard di calibrazione eseguire le seguenti operazioni nella successione indicata:

Equilibratura delle Sample Clean Up Columns

1. Collocare le Sample Clean Up Columns nelle provette per la preparazione del campione
2. Immettere in ciascuna Sample Clean Up Column 0,8 ml di Equilibration Reagent 1
3. Centrifugare per 1 min a 400 x g, verificare che l'eluizione sia completa, eliminare l'eluato
4. Ripetere i passi 2 e 3 con 0,8 ml di Equilibration Reagent 2

Preparazione del campione con Sample Clean Up Columns

5. Collocare in ciascuna Sample Clean Up Column 500 µl di campione/soluzione di calibrazione/controllo ben omogeneizzato
6. Aggiungere in ciascuna colonnina 50 µl di Internal Standard Mix e 450 µl di Extraction Buffer
7. Omogeneizzare il contenuto della Sample Clean Up Column (mescolare mediante vortex a bassa velocità per 15 secondi)
8. Centrifugare per 1 min a 400 x g, verificare che l'eluizione sia completa, eliminare l'eluato
9. Aggiungere 0,7 ml di Wash Buffer e centrifugare per 1 min a 400 x g, eliminare l'eluato
10. Aggiungere 0,7 ml di Wash Buffer e centrifugare a secco per 2 min a 3000 x g, eliminare l'eluato
11. Etichettare le vials per autocampionatore con micro inserto conico, collocarle in provette pulite per la preparazione del campione e collocarvi sopra le Sample Clean Up Columns
12. Aggiungere a ciascun campione 1 ml di Elution Buffer e centrifugare per 1 min a 400 x g

Concentrazione e iniezione

13. Far evaporare gli eluati nelle vials per autocampionatore con micro inserto conico in una corrente di azoto/aria compressa a 50 °C fino all'evaporazione (v. anche Capitolo 6: Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit)
14. Immettere 100 µl di Reconstitution Buffer nelle vials per autocampionatori con micro inserto conico e sigillarli
15. Agitare le vials per autocampionatore con micro inserto conico per 15 secondi mediante vortex
16. Trasferirle nell'autocampionatore
17. Iniettare 5-50 µl di eluato per ogni campione nel sistema LC-MS/MS

Per le avvertenze sulla determinazione del volume d'iniezione ottimale consultare il Capitolo 3.1.

5.5 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati

Poiché nella piastra di raccolta vi è il rischio che i campioni preparati evaporino, vanno analizzati entro un giorno. Nel caso in cui ciò non sia possibile, gli estratti dei campioni così ricavati, trasferiti in contenitori di vetro sigillati - analoghi ai vials per autocampionatore con micro inserto conico.

I campioni preparati per l'analisi come descritto al capitolo 5.4 sono stabili come segue:

Tabella 9: Stabilità dei campioni preparati

Temperatura di stoccaggio	Stabilità	Altre condizioni di stoccaggio
+20...+25 °C	3 giorni	contenitori di vetro, ben chiuso
+2...+8 °C	14 giorni	contenitori di vetro, ben chiuso
inferiore a -18 °C	14 giorni	contenitori di vetro, ben chiuso

5.6 Trattamento dei campioni al di fuori dell'intervallo lineare

I campioni dei pazienti contenenti concentrazioni di analiti superiori all'intervallo lineare (v. capitolo "Limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e linearità (Limite superiore di quantificazione)" nell'Allegato III: Dati relativi alle prestazioni) vanno trattati come segue:

Prima della preparazione dei campioni, diluire i campioni di partenza con soluzione fisiologica di cloruro di sodio isotonica (9,0 g/l) nel rapporto di 1:2,5 max. in modo che il risultato dell'analisi, senza tener conto del fattore di diluizione, si collochi nell'intervallo lineare. Preparare poi i campioni come descritto nel capitolo 5.4.1 o 5.4.2.

Nel calcolo delle concentrazioni di analiti dei campioni diluiti, tenere conto del relativo fattore di diluizione.

6 Equipaggiamento aggiuntivo necessario

Per la determinazione LC-MS/MS degli steroidi in siero/plasma occorre il seguente equipaggiamento aggiuntivo, che non fa parte del kit di reagenti:

- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo con ESI (a condizione che la sensibilità sia sufficiente)
- Sistema HPLC a gradiente (pressione di esercizio minima ammessa: 350 bar) con termostato per colonne e campionatore con funzione di raffreddamento

In caso di utilizzo di piastre per steroidi a 96 pozzetti SPE

- Agitatore per piastre a 96 pozzetti
- Centrifuga (ad es. Eppendorf (Centrifuga 5810 con rotore A-4-81 con almeno 2 cestelli MTP/Flex. da almeno 62 mm di altezza) o Hettich (UNIVERSAL 320 classic con rotore 1460 e 2 cestelli 1453 da min. 62 mm di altezza))
- Concentratore di campioni per piastre a 96 pozzetti (ad es. Techne®, Sample Concentrator con Dri-Block® Heater; inserti ottimizzati per piastra a 96 pozzetti per steroidi acquistabili tramite Chromsystems; in alternativa è disponibile presso Chromsystems il sistema completo, codice 42720)

In caso di utilizzo di Sample Clean Up Columns:

- Miscelatore Vortex™
- Centrifuga (ad es. Eppendorf (Centrifuga 5810 con rotore A-4-81 con almeno 2 cestelli e inserti per recipienti (Ø 17 mm, 95 mm di lunghezza) o Hettich (UNIVERSAL 320 classic con apposito rotore per almeno 2 cestelli e inserti per recipienti (Ø 17 mm, 95 mm di lunghezza))
- Concentratore di campioni per vials (ad es. Techne®, Sample Concentrator con Dri-Block® Heater; inserti ottimizzati acquistabili tramite Chromsystems; in alternativa è disponibile presso Chromsystems il sistema completo, codice 42730)

7 Acquisizione e valutazione dei dati

A ogni serie di misurazione, eseguire una calibrazione completa del sistema di valutazione. A questo scopo utilizzare gli standard di calibrazione **6PLUS1®-Multilevel** (codice 72038 e 72039). Le concentrazioni dei singoli analiti negli standard di calibrazione possono variare da lotto a lotto. I valori esatti sono riportati nei relativi foglietti illustrativi.

Acquisizione/valutazione per tutti gli analiti eccetto l'estradiolo:

Per produrre una retta di calibrazione, i rapporti delle superfici dei picchi (analita/ISTD) si riportano sull'asse y e le concentrazioni degli standard di calibrazione sull'asse x. Per tutti gli analiti, produrre infine una retta di calibrazione mediante regressione lineare e valutazione ponderata $1/x^2$ (diidrotestosterone: valutazione ponderata $1/x$). Mediante le rette di calibrazione ottenute possono infine essere calcolate le concentrazioni dei campioni processati.

Acquisizione/valutazione per l'estradiolo:

Per produrre una retta di calibrazione, i rapporti delle altezze dei picchi (analita/ISTD) si riportano sull'asse y e le concentrazioni degli standard di calibrazione sull'asse x. Produrre infine una retta di calibrazione mediante regressione lineare e valutazione ponderata $1/x^2$. Mediante le rette di calibrazione ottenute possono infine essere calcolate le concentrazioni dei campioni processati.

Per garantire che le condizioni di analisi LC-MS/MS non subiscano variazioni nel corso della sequenza analitica, iniettare i controlli **MassCheck®** preparati almeno una volta nel corso dell'analisi di una serie di campioni e al termine della stessa.

Verificare regolarmente l'esattezza delle masse e la risoluzione dello spettrometro e ricalibrarlo se vengono individuate deviazioni. A tal fine, leggere attentamente le avvertenze contenute nel libretto d'istruzioni dell'apparecchio in uso e in caso di dubbio rivolgersi alla casa costruttrice.

8 Controllo di qualità

La precisione e l'accuratezza delle determinazioni vengono determinate analizzando i controlli (controlli **MassCheck®**, codici 0341, 0342, 0343, 0345, 0346, 0347) in ogni sequenza analitica. Se i risultati dei controlli di qualità cadono al di fuori dell'intervallo indicato sui foglietti illustrativi, controllare il sistema analitico. Se lo scostamento permane, ri-calibrare il sistema analitico.

9 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento elencati sono valori indicativi ricavati dalla letteratura [2, 6, 7, 8, 9, 10]. Possono discostarsi da altri dati pubblicati. Poiché i valori per i diversi steroidi variano notevolmente, in particolare in base all'età e al sesso, occorre definire gli intervalli di riferimento specifici per il proprio laboratorio. Nella definizione dei valori, occorre tenere conto anche delle normative vigenti a livello locale.

Tabella 10: Intervalli di riferimento per aldosterone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [2]
Bambini (supini)		
12 ore	Dosaggio immunologico	343-1253 ng/l
24 ore	Dosaggio immunologico	217-1054 ng/l
2 giorni	Dosaggio immunologico	191-1123 ng/l
3 giorni	Dosaggio immunologico	90-913 ng/l
4 giorni	Dosaggio immunologico	83-921 ng/l
5 giorni	Dosaggio immunologico	72-831 ng/l
6-31 giorni	Dosaggio immunologico	69-812 ng/l
1-12 mesi	Dosaggio immunologico	69-552 ng/l
1-2 anni	Dosaggio immunologico	61-495 ng/l
2-6 anni	Dosaggio immunologico	40-271 ng/l
6-14 anni	Dosaggio immunologico	31-148 ng/l
Adulti		
seduti	LC/MS	< 25-229 ng/l
seduti	Dosaggio immunologico	65-285 ng/l
supini	Dosaggio immunologico	29-145 ng/l

Tabella 11: Intervalli di riferimento per androstenedione

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [6]	
		uomini	donne
Età			
0-1 giorno	non disponibile	150-1450 ng/l	150-1750 ng/l
1-<7 giorni	non disponibile	200-1110 ng/l	250-950 ng/l
7-28 giorni	non disponibile	250-1600 ng/l	90-900 ng/l
1-12 mesi	non disponibile	60-900 ng/l	60-1450 ng/l
1-<4 anni	non disponibile	60-350 ng/l	60-450 ng/l
P1*	non disponibile	250-1900 ng/l	30-600 ng/l
P2*	non disponibile	150-1200 ng/l	300-1450 ng/l
P3*	non disponibile	180-1450 ng/l	300-2000 ng/l
P4*	non disponibile	150-2200 ng/l	180-2600 ng/l
P5*	non disponibile	400-2600 ng/l	180-2600 ng/l
Adulti	non disponibile	500-2500 ng/l	500-2500 ng/l

*P = Stadio puberale

Tabella 12: Intervalli di riferimento per corticosterone

Prelievo del campione	Metodo	Intervallo di riferimento [7]
Valore del mattino	Dosaggio radioimmunologico	1-20 µg/l
dopo ACTH	Dosaggio radioimmunologico	< 65 µg/l

Tabella 13: Intervalli di riferimento per cortisolo

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento
Bambini (h 8)		
Età		Intervallo di riferimento [2]
5 giorni	Dosaggio immunologico	6-200 µg/l
2-12 mesi	Dosaggio immunologico	24-230 µg/l
2-15 anni	Dosaggio immunologico	25-230 µg/l
16-18 anni	Dosaggio immunologico	24-290 µg/l
Adulti		
Orario del prelievo		Intervallo di riferimento [2]
8 Uhr	Dosaggio immunologico	50-250 µg/l
24 Uhr	Dosaggio immunologico	< 5 µg/l

Tabella 14: Intervalli di riferimento per cortisone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [10]
Bambini	LC/MS	2,3-17,7 µg/l
Adulti	LC/MS	6-27 µg/l

Tabella 15: Intervalli di riferimento per 11-deossicorticosterone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [7]
Adulti	Dosaggio radioimmunologico	0,02-0,15 µg/l
dopo ACTH	Dosaggio radioimmunologico	< 0,9 µg/l
Prematuri	Dosaggio radioimmunologico	< 1,05 µg/l
Neonati	Dosaggio radioimmunologico	< 1,05 µg/l
Bambini 2-12 mesi	Dosaggio radioimmunologico	0,07-0,49 µg/l
Bambini 2-10 anni	Dosaggio radioimmunologico	0,02-0,34 µg/l

Tabella 16: Intervalli di riferimento per 11-deossicortisolo

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [7]
Adulti	Dosaggio radioimmunologico	0,5-3 µg/l
Prematuri	Dosaggio radioimmunologico	< 14 µg/l
Bambini (2 mesi- 12 anni)	Dosaggio radioimmunologico	0,2-2,5 µg/l

Tabella 17: Intervalli di riferimento per 21-deossicortisolo

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [7]
Adulti	Dosaggio radioimmunologico	0,02-0,15 µg/l
dopo ACTH	Dosaggio radioimmunologico	< 0,55 µg/l

Tabella 18: Intervalli di riferimento per deidroepiandrosterone (DHEA)

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [8]	
		uomini	donne
Età			
0-1 giorno	non disponibile	3,2-11 µg/l	4,6-12 µg/l
1-< 7 giorni	non disponibile	0,9-8,7 µg/l	1,2-9,3 µg/l
7-28 giorni	non disponibile	0,45-5,8 µg/l	0,9-5,8 µg/l
1-12 mesi	non disponibile	0,09-2,9 µg/l	0,17-1,7 µg/l
1-< 4 anni	non disponibile	0,12-0,9 µg/l	0,2-0,45 µg/l
P1*	non disponibile	0,25-3 µg/l	0,12-2 µg/l
P2*	non disponibile	0,5-5,8 µg/l	0,6-17 µg/l
P3*	non disponibile	1,3-6,4 µg/l	1,25-19 µg/l
P4*	non disponibile	1,9-7,3 µg/l	1,7-17 µg/l
P5*	non disponibile	2,3-7,3 µg/l	2,2-8,1 µg/l
Adulti	non disponibile	1,8-12,5 µg/l	1,3-9,8 µg/l

*P = Stadio puberale

Tabella 19: Intervalli di riferimento per diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [2]	
		uomini	donne
Bambini			
1-7 giorni	Dosaggio immunologico	855-4227 µg/l	656-4717 µg/l
8-15 giorni	Dosaggio immunologico	302-1758 µg/l	335-3497 µg/l
16 giorni bis 3 anni	Dosaggio immunologico	74-991 µg/l	74-1227 µg/l
4-6 anni	Dosaggio immunologico	74-2277 µg/l	74-468 µg/l
7-8 anni	Dosaggio immunologico	77-1187 µg/l	107-785 µg/l
9-10 anni	Dosaggio immunologico	147-184 µg/l	125-1942 µg/l
11 anni	Dosaggio immunologico	195-1912 µg/l	85-999 µg/l
12 anni	Dosaggio immunologico	118-3733 µg/l	247-2255 µg/l
13 anni	Dosaggio immunologico	136-2889 µg/l	214-1691 µg/l
14 anni	Dosaggio immunologico	140-2996 µg/l	221-3265 µg/l
15 anni	Dosaggio immunologico	520-4403 µg/l	324-3508 µg/l
16 anni	Dosaggio immunologico	302-3644 µg/l	560-3851 µg/l
17 anni	Dosaggio immunologico	999-3442 µg/l	855-4050 µg/l
18-19 anni	Dosaggio immunologico	1035-4750 µg/l	1426-4367 µg/l
Adulti			
		99-6154 µg/l	-
Reproduttivo	Dosaggio immunologico	-	≤ 5269 µg/l
Postmenopausa	Dosaggio immunologico	-	≤ 1179 µg/l

Tabella 20: Intervalli di riferimento per diidrotestosterone (DHT)

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [9]	
		uomini	donne
Età		uomini	donne
Prematuri	non disponibile	100-530 ng/l	20-130 ng/l
Lattanti (nati a termine)	non disponibile	50-600 ng/l	< 20-150 ng/l
1-7 mesi	non disponibile	*	**
Bambini (prepuberale)	non disponibile	< 30 ng/l	< 30 ng/l
Pubertà - Stadio di Tanner			
1 (< 9,8 anni)	non disponibile	< 30 ng/l	< 30 ng/l
2 (9,8-14,5 anni)	non disponibile	30-170 ng/l	50-120 ng/l
3 (10,7-15,4 anni)	non disponibile	80-330 ng/l	70-190 ng/l
4 (11,8-16,2 anni)	non disponibile	220-520 ng/l	40-130 ng/l
5 (12,8-17,3 anni)	non disponibile	240-650 ng/l	30-180 ng/l
Intervallo di riferimento [10]			
uomini	non disponibile	250-750 ng/l	
donne	non disponibile	50-300 ng/l	

- * Il livello di DHT si abbassa rapidamente nella prima settimana e poi aumenta di nuovo nei successivi 30-60 giorni a 120-850 ng/l. Successivamente, nell'arco di 7 mesi, i valori riscendono ai livelli della fase prepuberale.
- ** I valori scendono durante il primo mese al di sotto di 30 ng/l e si mantengono su questi valori fino alla pubertà

Tabella 21: Intervalli di riferimento per estradiolo

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [2]	
		uomini	donne
Bambini			
1-7 giorni	Dosaggio immunologico	< 5,4-62,4 ng/l	6,8-31,6 ng/l
8-15 giorni	Dosaggio immunologico	8,4-34,3 ng/l	11,4-36,5 ng/l
16 giorni - 3 anni	Dosaggio immunologico	< 5,4-17,7 ng/l	5,7-30,8 ng/l
4-6 anni	Dosaggio immunologico	7,9-33,0 ng/l	< 5,4-22,1 ng/l
7-8 anni	Dosaggio immunologico	< 5,4-22,6 ng/l	6,3-24,0 ng/l
9-10 anni	Dosaggio immunologico	< 5,4-22,1 ng/l	< 5,4-47,9 ng/l
11 anni	Dosaggio immunologico	7,6-30,0 ng/l	9,0-51,2 ng/l
12 anni	Dosaggio immunologico	7,1-35,7 ng/l	< 5,4-60,2 ng/l
13 anni	Dosaggio immunologico	5,4-63,2 ng/l	< 5,4-42,8 ng/l
14 anni	Dosaggio immunologico	6,0-74,4 ng/l	11,4-147,4 ng/l
15 anni	Dosaggio immunologico	< 5,4-82,3 ng/l	6,8-247,6 ng/l
16 anni	Dosaggio immunologico	10,9-37,3 ng/l	20,7-231,3 ng/l
17 anni	Dosaggio immunologico	10,9-37,3 ng/l	13,3-138,1 ng/l
18-19 anni	Dosaggio immunologico	7,6-35,1 ng/l	14,4-187,4 ng/l
Adulti			
—	non disponibile	< 50,1 ng/l	—
Follicolare	non disponibile	—	50,1-144,9 ng/l
Ovulazione	non disponibile	—	111,9-442,9 ng/l
Luteale	non disponibile	—	50,1-241,1 ng/l
Postmenopausa	non disponibile	—	< 59,1 ng/l

Tabella 22: Intervalli di riferimento per 17 α -idrossiprogesterone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [7]
Adulti	Dosaggio radioimmunologico	0,2-2,2 $\mu\text{g/l}$
Donne (postmenopausa)	Dosaggio radioimmunologico	0,05-0,5 $\mu\text{g/l}$
Prematuri	Dosaggio radioimmunologico	2,5-20 $\mu\text{g/l}$
Neonati	Dosaggio radioimmunologico	< 3 $\mu\text{g/l}$
Bambini 2-11 mesi	Dosaggio radioimmunologico	0,07-2 $\mu\text{g/l}$
Bambini 1-10 anni	Dosaggio radioimmunologico	0,03-0,9 $\mu\text{g/l}$
Bambini 10-17 anni	Dosaggio radioimmunologico	0,1-2,2 $\mu\text{g/l}$

Tabella 23: Intervalli di riferimento per progesterone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [2]	
		uomini	donne
Bambini			
1-7 giorni	Dosaggio immunologico	0,31-3,93 $\mu\text{g/l}$	0,25-3,11 $\mu\text{g/l}$
8-15 giorni	Dosaggio immunologico	0,31-2,58 $\mu\text{g/l}$	0,31-1,48 $\mu\text{g/l}$
16 giorni - 3 anni	Dosaggio immunologico	0,09-1,13 $\mu\text{g/l}$	0,09-1,01 $\mu\text{g/l}$
4-6 anni	Dosaggio immunologico	0,13-2,74 $\mu\text{g/l}$	0,09-1,10 $\mu\text{g/l}$
7-8 anni	Dosaggio immunologico	0,22-1,10 $\mu\text{g/l}$	0,25-1,13 $\mu\text{g/l}$
9-10 anni	Dosaggio immunologico	0,13-1,23 $\mu\text{g/l}$	0,13-1,10 $\mu\text{g/l}$
11 anni	Dosaggio immunologico	0,22-1,13 $\mu\text{g/l}$	0,35-0,94 $\mu\text{g/l}$
12 anni	Dosaggio immunologico	0,31-1,60 $\mu\text{g/l}$	0,47-1,86 $\mu\text{g/l}$
13 anni	Dosaggio immunologico	0,38-1,51 $\mu\text{g/l}$	0,38-1,51 $\mu\text{g/l}$
14 anni	Dosaggio immunologico	0,35-1,29 $\mu\text{g/l}$	0,47-13,11 $\mu\text{g/l}$
15 anni	Dosaggio immunologico	0,63-3,02 $\mu\text{g/l}$	0,47-14,37 $\mu\text{g/l}$
16 anni	Dosaggio immunologico	0,69-4,56 $\mu\text{g/l}$	0,57-14,75 $\mu\text{g/l}$
17 anni	Dosaggio immunologico	0,69-2,17 $\mu\text{g/l}$	0,72-12,96 $\mu\text{g/l}$
18-19 anni	Dosaggio immunologico	1,16-3,02 $\mu\text{g/l}$	1,19-13,58 $\mu\text{g/l}$
Adulti			
—	non disponibile	< 0,19-1,40 $\mu\text{g/l}$	—
Follicolare	non disponibile	—	< 0,19 $\mu\text{g/l}$
Fase luteinica centrale	non disponibile	—	2,99-20,0 $\mu\text{g/l}$
Postmenopausa	non disponibile	—	< 0,94 $\mu\text{g/l}$

Tabella 24: : Intervalli di riferimento per testosterone

Popolazione di pazienti	Metodo	Intervallo di riferimento [7]	
		uomini	donne
Adulti	Dosaggio radioimmunologico	2,5-10 µg/l	0,2-0,8 µg/l
Prematuri	Dosaggio radioimmunologico	< 2 µg/l	< 0,22 µg/l
Neonati	Dosaggio radioimmunologico	< 4 µg/l	< 0,65 µg/l
Bambini 1-5 mesi	Dosaggio radioimmunologico	0,1-4 µg/l	—
Bambini 6 mesi - 9 anni (m)	Dosaggio radioimmunologico	0,02-0,2 µg/l	—
Bambini 2 mesi - 9 anni (f)	Dosaggio radioimmunologico	—	0,02-0,2 µg/l
Bambini 10-16 anni	Dosaggio radioimmunologico	0,1-9,5 µg/l	0,02-0,8 µg/l

Avviso/Avvertenza

Gli intervalli di riferimento qui indicati sono ricavati dalla letteratura. Non esiste alcun intervallo di riferimento generalmente valido per gli steroidi in siero e plasma. I valori ricavati con metodi di test differenti non possono essere messi a confronto. Per poter interpretare correttamente i risultati, i laboratori devono indicare il metodo utilizzato per l'analisi.

10 Fattori di conversione

La tabella sottostante elenca i fattori per la conversione della concentrazione molare nella concentrazione in peso e viceversa.

Tabella 25: Fattori di conversione

Sostanza	da µg/l a nmol/l	da nmol/l a µg/l
Aldosterone	x 2,77	x 0,3604
Androstenedione	x 3,49	x 0,2864
Corticosterone	x 2,89	x 0,3464
Cortisolo	x 2,76	x 0,3625
Cortisone	x 2,77	x 0,3605
11-Deossicorticosterone	x 3,03	x 0,3305
11-Deossicortisolo	x 2,89	x 0,3465
21-Deossicortisolo	x 2,89	x 0,3465
DHEA	x 3,47	x 0,2884
DHEAS	x 2,71	x 0,3685
Diidrotosterone	x 3,44	x 0,2904
Estradiolo	x 3,67	x 0,2724
17 α -Idrossiprogesterone	x 3,03	x 0,3305
Progesterone	x 3,18	x 0,3145
Testosterone	x 3,47	x 0,2884

11 Stoccaggio e stabilità dei reagenti

Osservando le avvertenze per il trasporto e lo stoccaggio e in confezione integra, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Trasportare e conservare i reagenti osservando le avvertenze fornite di seguito.

Tabella 26: Condizioni di trasporto del kit di reagenti

Prodotto	Temperatura di trasporto
Kit di reagenti (codice 72072)	+18... +30 °C

Estrarre i reagenti dalla confezione immediatamente dopo il trasporto e stoccare ogni singolo reagente come indicato nella seguente tabella.

Tabella 27: Condizioni di stoccaggio dei reagenti

Prodotto	Temperatura di stoccaggio
Mobile Phase A (codice 72011)	+18... +30 °C
Mobile Phase B (codice 72002)	+18... +30 °C
Rinsing Solution (codice 72009)	+18... +30 °C
Elution Buffer (codice 72033)	+18... +30 °C
Extraction Buffer (codice 72005)	+18... +30 °C
Reconstitution Buffer (codice 72006)	+18... +30 °C
Equilibration Reagent 1 (codice 72077)	+18... +30 °C
Equilibration Reagent 2 (codice 72008)	+18... +30 °C
Wash Buffer (codice 72012)	+18... +30 °C
Internal Standard Mix (codice 72044)	< -18 °C
Tuning Mix (codice 72019 e 72020)	< -18 °C
System Check Solution (codice 72088 e 72099)	< -18 °C
6PLUS1 ® Multilevel Serum Calibrator Set (codice 72038 e 72039)	< -18 °C
MassCheck ® Serum Controls (codice 0341, 0342, 0343, 0345, 0346, 0347)	< -18 °C

Chiudere i reagenti immediatamente dopo l'uso e conservarli alla temperatura indicata. I reagenti possono essere conservati per un anno dalla data di apertura, ma non oltre la data di scadenza indicata. Per la stabilità degli standard di calibrazione e dei controlli ricostituiti vedi paragrafi 5.2 e 5.3.

12 Smaltimento dei rifiuti

La Mobile Phase A, la Mobile Phase B, l'Elution Buffer, l' Internal Standard Mix, il Reconstitution Buffer, l'Equilibration Reagent 1, la Rinsing Solution, il Tuning Mix (Steroid Panel 1 e 2) e il System Check Solution (Steroid Panel 1 e 2) contengono solventi organici. Collocare i residui in contenitori appositi, per solventi organici non alogenati.

I residui dei campioni dei pazienti e i campioni preparati, così come i controlli e gli standard di calibrazione sono potenzialmente infettivi e devono pertanto essere raccolti e smaltiti come rifiuti potenzialmente infettivi.

Le soluzioni menzionate non possono essere smaltite né come rifiuto domestico, né attraverso la rete fognaria pubblica. Smaltire ai sensi della Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti, nonché delle normative nazionali e regionali. Tenere i recipienti e i contenitori per la raccolta fuori dalla portata di persone non autorizzate.

13 Esempi di cromatogrammi

Le seguenti figure illustrano vari esempi di cromatogrammi determinati con il presente metodo.

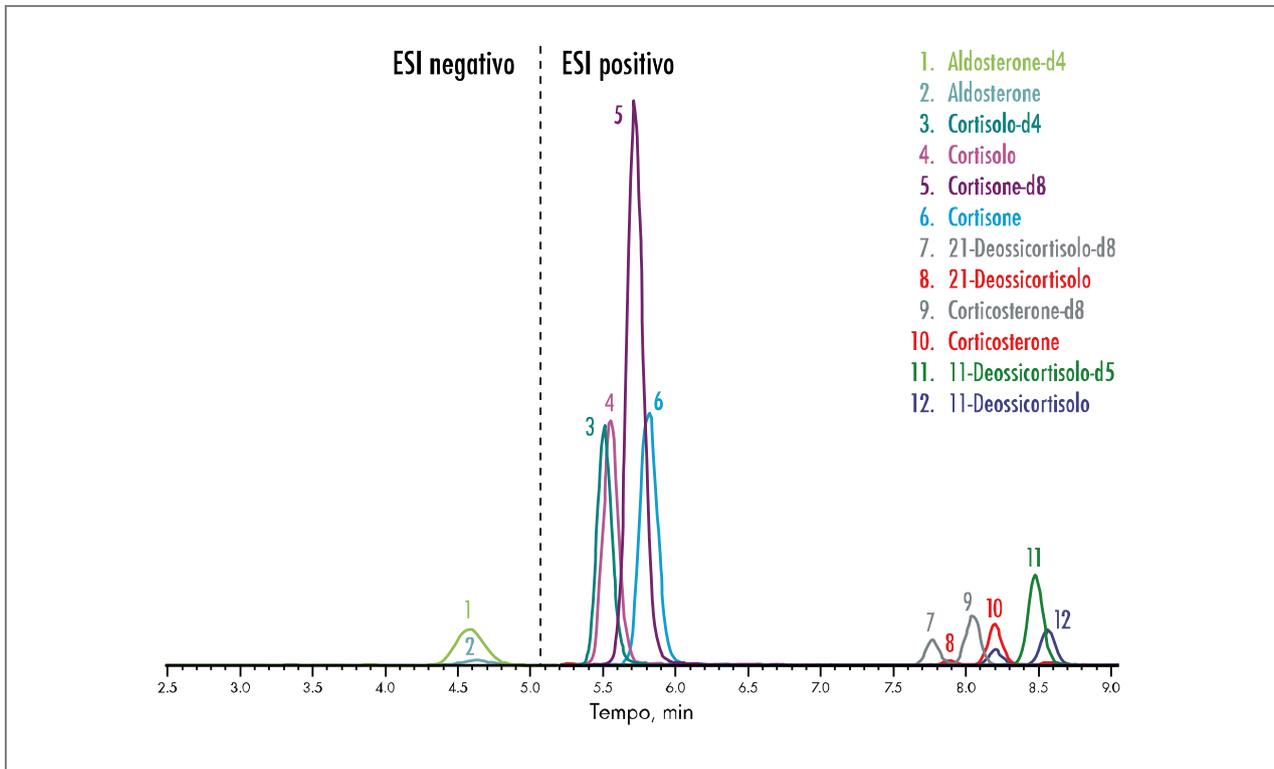


Figura 4: Cromatogramma di un *MassCheck*® Steroid Panel 1 Serum Control Level II

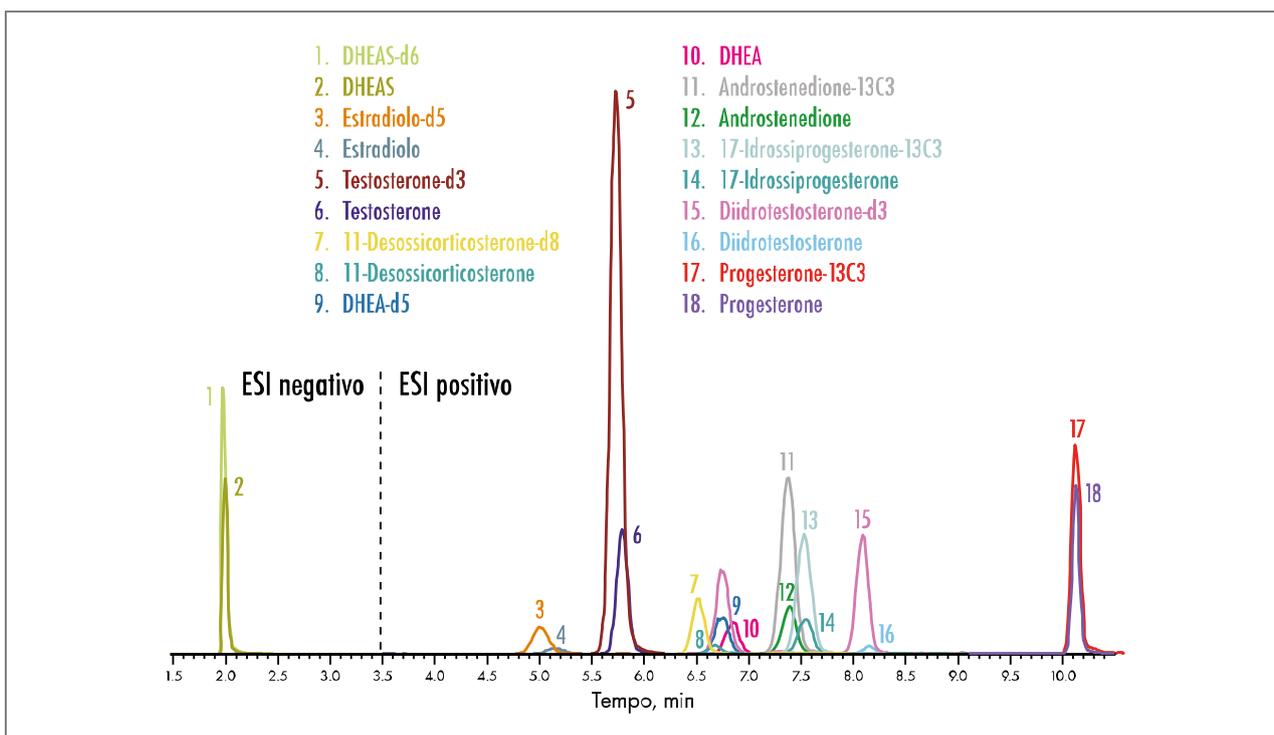


Figura 5: Cromatogramma di un *MassCheck*® Steroid Panel 2 Serum Control Level II

14 Valutazione delle interferenze

I campioni di siero sono stati addizionati con sostanze isobare, metaboliti e farmaci alle concentrazioni più elevate attese e analizzati con uno spettrometro di massa Waters Xevo™ TQS o SCIEX QTRAP® 5500 alla ricerca di eventuali interferenze.

Le seguenti sostanze testate non hanno prodotto interferenze degne di nota, né influenzato i risultati quantitativi (deviazione ≤ 15 %):

Sostanze isobari/metaboliti

Allodiiidrocortisone, 4-androstenediolo, androsterone, androsterone solfato, dienedione, 4-diidrobaldenone, 20 α -diidroprednisolone, 20 β -diidroprednisolone, 20 β -diidroprednisone, 5 α -diidrotestosterone solfato, dromostanolone propionato, epiandrosterone, epitestosterone, epitestosterone acetato, 17 α -estradiolo, estriolo, estrone, eticolanolone, 18-idrossicorticosterone, 11 α -idrossiprogesterone, 16 α -idrossiprogesterone, 19-nor-4-androstenedione, prednisolone, prednisone, testosterone acetato, trenbolone, acido ursocolanico.

Farmaci

Acetazolamide, acetilcisteina, N-acetil-procainamide, acido acetilsalicilico, aciclovir, allopurinolo, amikacina, amlodipina, amoxicillina, ampicillina, azatioprina, azitromicina, bisoprololo, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epossido, cefradina, cloramfenicolo, clordiazepossido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, N-desmetildiazepam, 1,1-dimetilbiguanide, diazepam, diclofenac, digitossina, digossina, diidrocodeina, disopiramide, enalaprilato, eritromicina, furosemide, ganciclovir, gentamicina, idroclorotiazide, ibuprofene, isosorbide dinitrato, itraconazolo, ketoconazolo, levofloxacina, levotirossina, lidocaina, lorazepam, metilprednisolone, metoclopramide, metoprololo, acido micofenolico glucuronide, nadololo, fluoruro di sodio, neomicina, norverapamil, omeprazolo, ossipurinolo, paracetamolo, penicillina V, fenitoina, prazosina, prednisolone, prednisone, procainamide, (\pm)-propranololo, ranitidina, rifampicina, risperidone, salbutamolo, acido salicilico, streptomina, sulfametossazolo, tramadolo, triamterene, trimetoprim, acido valproico, vancomicina, verapamil.

In presenza di queste sostanze potrebbero essere osservate interferenze:

Lo steroide sintetico 4-pregnene-16 α ,17 α -diolo-3,20-dione (algestone) eluisce tra gli analiti 21-deossicortisolo e corticosterone, ma è visibile solo sulle transizioni Qualifier-MRM 347 \rightarrow 7 e 347 \rightarrow 109. La quantificazione mediante transizione Quantifier-MRM (347 \rightarrow 121) non è interessata, per entrambi gli analiti.

La sostanza anabolizzante metilestrenolone (4-estreno-17 α -metil-17 β -olo-3-one) (normetandrone) interferisce con il testosterone. Entrambe le sostanze coeluiscono, ed è pertanto possibile ottenere risultati falsamente alti di testosterone. Nella MRM 2 (289 \rightarrow 109) l'interferenza è molto più forte che nella MRM 1 (289 \rightarrow 97).

L'11 β -idrossiprogesterone, uno steroide endogeno, eluisce circa 0,2 min. dopo l'11-deossicorticosterone, disturbandone maggiormente la MRM 2 (331 \rightarrow 97) più che la MRM 1 (331 \rightarrow 109). Il dato compromesso è il rapporto qualifier/quantifier, non la quantificazione.

La penicillina G, un antibiotico β -lattamico, provoca soppressione ionica per l'aldosterone (analita e ISTD). Sono possibili risultati falsamente bassi.

La meticillina, un'isossazolil penicillina, causa soppressione ionica per l'aldosterone (analita e ISTD). Sono possibili risultati falsamente alti.

L'oxazepam, un agonista delle benzodiazepine, causa soppressione ionica dell'ISTD del corticosterone. Sono possibili risultati falsamente alti.

Il desametasone, un glucocorticoide sintetico, interferisce con l'ISTD del 21-deossicortisolo. Sono interessate tutte le MRM. Sono possibili risultati falsamente bassi.

La nifedipina, un calcioantagonista, causa soppressione ionica dell'ISTD dell'11-deossicorticosterone. Sono interessate tutte le MRM. Sono possibili risultati falsamente alti.

L'acido micofenolico, un immunosoppressore, interferisce con l'estradiolo e causa soppressione ionica dell'ISTD dell'estradiolo, che può influenzare la precisione dei risultati di analisi. Sono interessate tutte le MRM.

Utilizzando provette per prelievi con litio-eparina sono state osservate interferenze:

Su entrambe le MRM dell'aldosterone-d4, prima dello standard interno eluisce un picco di disturbo non completamente separato, che può influenzare la precisione dei risultati di analisi.

Per qualsiasi domanda riguardante possibili interferenze, si prega di rivolgersi al nostro Servizio Clienti oppure direttamente alla nostra hotline (+49 89 18930-111) o di inviare una mail al nostro servizio assistenza Chromsystems (support@chromsystems.com).

15 Limitazioni cliniche

Non esistono intervalli terapeutici generalmente validi per il kit di reagenti LC-MS/MS **MassChrom**® Steroidi in siero/plasma. I valori ricavati con metodi di test differenti non possono essere messi a confronto. Per poter interpretare correttamente i risultati, i laboratori devono indicare il metodo utilizzato per l'analisi.

Ciascun utilizzatore deve stabilire i propri intervalli di riferimento in base alle valutazioni cliniche. Non utilizzare i fattori di conversione tra i diversi metodi di analisi per ricavare i valori individuali dei pazienti.

16 Risoluzione dei problemi

Tabella 28: Risoluzione dei problemi

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
Picchi di disturbo	Sistema di iniezione sporco	Pulire con metanolo o iniettare 10 volte la Mobile Phase
	Contenitori dei campioni sporchi	Utilizzare contenitori nuovi
	Setto del contenitore del campione	Utilizzare un altro setto
	Fasi mobili o colonne contaminate	Cambiare le fasi mobili o le colonne e lavare il sistema
	Risoluzione della massa troppo bassa	Ottimizzare la risoluzione della massa
Segnale assente	Iniettore guasto	Controllare l'iniettore
	Pompa guasta	Ispezionare la pompa
	Capillari di trasferimento non collegati alla sorgente ionica	Collegare i capillari alla sorgente ionica
	Sistema MS/MS non pronto	Controllare il sistema MS/MS
Sensibilità ridotta	Sorgente ionica sporca	Pulire la sorgente ionica
	Spettrometro di massa sporco	Pulire lo spettrometro di massa
	La valvola dell'iniettore perde	Controllare l'iniettore
	Rilevatore vecchio	Sostituire il rilevatore o aumentare la tensione del moltiplicatore.
Forti oscillazioni del segnale	Ionizzazione instabile	Verificare la sorgente ionica, eventualmente ottimizzare la tensione o i flussi dei gas
	Flusso non uniforme	Controllare la pompa HPLC
	Flusso di gas instabile	Controllare i flussi e l'alimentazione del gas.
Non si produce il vuoto	Pompe per vuoto guaste	Controllare la pompa di prevuoto e quella per l'alto vuoto
	Perdita nel sistema di vuoto	Controllare i tubi e i raccordi del sistema di vuoto
Alimentazione del gas assente	Generatore di azoto guasto	Controllare il generatore di azoto
	Compressore guasto	Controllare il compressore
	Bombola del gas vuota	Sostituire la bombola del gas
	Pressioni d'ingresso del gas fuori dai valori nominali	Regolare le pressioni d'ingresso del gas

17 Bibliografia

1. World Health Organization. (2002) Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations & Stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2
2. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
3. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Owen WE, Bunker AM, Meikle AW. (2006) Development and performance evaluation of a tandem mass spectrometry assay for 4 adrenal steroids. *Clin Chem* **52**(8): 1559-67.
4. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandle TG. (2001) Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem* **34**(2): 107-12.
5. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 7. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2008).
6. Soldin SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (eds). Androstenedione. In: Pediatric Reference Intervals. 7th edition, pp 35-7. AACC Press Washington DC (2011).
7. Uni Heidelberg (Medizinische Fakultät\Pharmakologisches Institut\Steroidlabor)
<http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/Steroidlabor.102636.0.html>, Normalwerte.pdf (Stand 01.07.2016)
8. Soldin SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (eds). Dehydroepiandrosterone (DHEA). In: Pediatric Reference Intervals. 7th edition, pp 90-1. AACC Press Washington DC (2011).
9. Soldin SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (eds). Dihydrotestosterone (DHT). In: Pediatric Reference Intervals. 7th edition, pp 98. AACC Press Washington DC (2011).
10. Shackleton C. (2008) Genetic disorders of steroid metabolism diagnosed by mass spectrometry. In: Blau N, Duran M, Gibson KM (eds). Laboratory guide to the methods in biochemical genetics, pp 549-606. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

Allegato I: Avvertenze sulle sostanze pericolose

Quando si manipolano i reagenti, osservare le seguenti avvertenze relative alle sostanze pericolose e adottare le opportune misure di sicurezza. Altre informazioni sono contenute nelle schede di sicurezza. Queste possono essere scaricate dal nostro sito web www.chromsystems.com oppure richiesti ai nostri uffici.

Tabella 29: Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza

Pittogrammi	Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza	
Mobile Phase A (codice 72011)		
  	<p>Pericolo</p> <p>H226 Liquido e vapori infiammabili. H302+H312+H332 Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P312 IN CASO DI INGESTIONE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>	
	Mobile Phase B (codice 72002)	
	 	<p>Pericolo</p> <p>H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H302+H312+H332 Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H319 Provoca grave irritazione oculare.</p> <p>P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P241 Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/a prova di esplosione. P243 Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p>
Elution Buffer (codice 72033)		
 	<p>Pericolo</p> <p>H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H302+H312+H332 Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H319 Provoca grave irritazione oculare.</p> <p>P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P241 Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/a prova di esplosione. P243 Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p>	

Pittogrammi

Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza

Internal Standard Mix (codice 72044)

**Pericolo**

H226 Liquido e vapori infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H370 Provoca danni agli organi.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.



Reconstitution Buffer (codice 72006)

**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H370 Provoca danni agli organi.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.



Equilibration Reagent 1 (codice 72077)

**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H370 Provoca danni agli organi.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P312 IN CASO DI INGESTIONE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.



Rinsing Solution (codice 72009)

**Pericolo**

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H370 Provoca danni agli organi.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.



Pittogrammi	Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza
Tuning Mixes (codice 72019, 72020)	
  	<p>Pericolo</p> <p>H226 Liquido e vapori infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>
System Check Solutions (codice 72088, 72099)	
  	<p>Pericolo</p> <p>H226 Liquido e vapori infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>
<p>I componenti non sono classificati come pericolosi ai sensi della normativa europea:</p> <p>Extraction Buffer (codice 72005) Equilibration Reagent 2 (codice 72008) Wash Buffer (codice 72012) 6PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Sets (codice 72038, 72039) MassCheck® Serum Controls (codice 0341, 0342, 0343, 0345, 0346, 0347)</p>	

Allegato II: Calcolo manuale

Confrontare i quozienti delle superfici dei picchi degli analiti e delle superfici dei picchi dello standard interno con le concentrazioni degli analiti (per l'estradiolo i quozienti delle altezze dei picchi). Per regressione lineare, ponderata $1/x^2$ (diidrotestosterone: ponderata $1/x$), si ottiene la pendenza della retta di calibrazione, dalla quale si calcola la concentrazione dei campioni.

Per il calcolo manuale occorrono i seguenti dati:

- Superficie/altezza dei picchi dell'analita A nel cromatogramma MRM = A_{Campione}
- Superficie/altezza dei picchi dello standard interno nel cromatogramma MRM = IS_{Campione}
- Gradiente della retta di calibrazione = a
- Intercetta della retta di calibrazione = b

Calcolare quindi la concentrazione dell'analita A nel campione (C_{Campione}) con la seguente formula:

$$C_{\text{Campione}} = \frac{(A_{\text{Campione}} / IS_{\text{Campione}}) - b}{a}$$

Allegato III: Dati relativi alle prestazioni

Le prestazioni sono state rilevate e verificate sui seguenti apparecchi:

- spettrometro di massa SCIEX QTRAP® 5500 con sistema UHPLC Shimadzu Nexera
- spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S con sistema UHPLC ACQUITY™ UPLC® H-Class

Se questo kit **MassChrom®** (codice 72072) viene utilizzato su uno spettrometro di massa diverso da quelli qui citati, l'utente deve validare il metodo sull'apparecchio in uso.

Recupero

Il recupero analitico relativo è stato ricavato con matrici sieriche e plasmatiche. A questo scopo la matrice è stata addizionata più volte con gli analiti. Sono state analizzate tre diverse concentrazioni negli intervalli di lavoro degli analiti. Il tasso di recupero si calcola con la seguente equazione:

$$\text{Recupero [\%]} = \frac{\text{Concentrazione misurata nel campione fortificato} - \text{Concentrazione nel campione nativo}}{\text{Concentrazione spiked}} \times 100$$

Tabella 30: Tassi di recupero, determinazione con spettrometro di massa SCIEX QTRAP® 5500

Sostanza	Tasso di recupero nel siero (concentrazione aggiunta in µg/l)			Tasso di recupero nel plasma (concentrazione aggiunta in µg/l)		
Aldosterone	103 % (0,065)	95 % (0,360)	97 % (2,00)	105 % (0,065)	94 % (0,360)	96 % (2,00)
Androstenedione	106 % (0,400)	97 % (2,00)	105 % (15,0)	100 % (0,4)	97 % (2,00)	105 % (15,0)
Corticosterone	101 % (1,21)	99 % (4,99)	105 % (42,7)	109 % (1,21)	102 % (4,99)	103 % (42,7)
Cortisolo	107 % (23,5)	93 % (97,7)	101 % (192)	114 % (23,5)	97 % (97,7)	103 % (192)
Cortisone	108 % (3,69)	97 % (11,0)	98 % (31,1)	98 % (3,69)	96 % (11,0)	99 % (31,1)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	94 % (2,38)	103 % (10,9)	104 % (63,3)	98 % (2,38)	101 % (10,9)	106 % (63,3)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	101 % (435)	90 % (1630)	97 % (4920)	107 % (435)	93 % (1630)	98 % (4920)
11-Deossicorticosterone	111 % (0,475)	94 % (3,29)	94 % (20,9)	117 % (0,475)	92 % (3,29)	96 % (20,9)
11-Deossicortisolo	86 % (0,095)	95 % (1,52)	100 % (14,2)	110 % (0,095)	96 % (1,52)	99 % (14,2)
21-Deossicortisolo	92 % (0,166)	102 % (1,02)	101 % (5,04)	95 % (0,166)	96 % (1,02)	100 % (5,04)
Diidrotestosterone	98 % (0,250)	108 % (0,684)	104 % (1,71)	104 % (0,250)	109 % (0,684)	103 % (1,71)
Estradiolo	100 % (0,100)	100 % (0,500)	100 % (5,00)	97 % (0,100)	92 % (0,500)	100 % (5,00)
17α-Idrossiprogesterone	81 % (0,104)	92 % (0,358)	99 % (1,21)	90 % (0,358)	103 % (0,523)	100 % (1,21)
Progesterone	88 % (0,500)	101 % (5,00)	108 % (19,9)	88 % (0,500)	93 % (5,00)	101 % (19,9)
Testosterone	92 % (0,277)	95 % (0,474)	99 % (7,19)	94 % (0,277)	86 % (0,474)	98 % (7,19)

Tabella 31: Tassi di recupero, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S

Sostanza	Tasso di recupero nel siero (concentrazione aggiunta in µg/l)			Tasso di recupero nel plasma (concentrazione aggiunta in µg/l)		
Aldosterone	106 % (0,068)	95 % (0,356)	113 % (1,67)	99 % (0,068)	96 % (0,356)	112 % (1,67)
Androstenedione	94 % (0,400)	96 % (2,00)	108 % (15,0)	95 % (0,4)	96 % (2,00)	108 % (15,0)
Corticosterone	111 % (1,35)	101 % (5,11)	111 % (40,8)	103 % (1,31)	96 % (5,11)	111 % (40,8)
Cortisolo	105 % (23,4)	100 % (100)	100 % (201)	106 % (23,4)	100 % (100)	100 % (201)
Cortisone	110 % (3,69)	107 % (10,4)	104 % (32,1)	104 % (3,69)	104 % (10,4)	102 % (32,1)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	83 % (2,44)	84 % (11,7)	89 % (65,3)	86 % (2,44)	86 % (11,7)	93 % (65,3)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	91 % (433)	92 % (1584)	96 % (5074)	92 % (433)	91 % (1584)	96 % (5074)
11-Deossicorticosterone	107 % (0,091)	99 % (0,484)	101 % (2,94)	107 % (0,091)	101 % (0,484)	102 % (2,94)
11-Deossicortisolo	115 % (0,093)	97 % (1,57)	99 % (14,7)	105 % (0,093)	97 % (1,57)	98 % (14,7)
21-Deossicortisolo	87 % (0,176)	94 % (1,11)	102 % (5,08)	82 % (0,176)	91 % (1,11)	98 % (5,08)
Diidrotestosterone	83 % (0,249)	94 % (0,680)	96 % (1,74)	99 % (0,249)	104 % (0,680)	101 % (1,74)
Estradiolo	90 % (0,100)	103 % (0,500)	96 % (5,00)	92 % (0,100)	98 % (0,500)	95 % (5,00)
17α-Ildrossiprogesterone	101 % (0,510)	99 % (2,10)	100 % (7,69)	102 % (0,510)	98 % (2,10)	100 % (7,69)
Progesterone	88 % (0,500)	101 % (5,00)	109 % (19,9)	87 % (0,500)	103 % (5,00)	110 % (19,9)
Testosterone	103 % (0,262)	101 % (0,432)	96 % (7,36)	104 % (0,262)	100 % (0,432)	97 % (7,36)

Limite di quantificazione inferiore (LLOQ) e linearità (limite di quantificazione superiore)

La linearità è stata determinata con il "metodo delle aggiunte standard" addizionando quantità definite di sostanze standard a siero/plasma. Il limite di quantificazione è stato ricavato analizzando diluizioni definite di siero con siero bianco.

La risposta prodotta dal metodo è lineare dal limite di quantificazione (LLOQ) fino almeno al limite superiore dichiarato (intervallo lineare).

Tabella 32: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con spettrometro di massa SCIEX QTRAP® 5500

Sostanza	Limite di quantificazione	Intervallo di linearità fino ad almeno	
	siero	siero	plasma
Aldosterone	0,014 µg/l	6,00 µg/l	6,00 µg/l

Sostanza	Limite di quantificazione	Intervallo di linearità fino ad almeno	
		siero	plasma
Androstenedione	0,023 µg/l	18,0 µg/l	27,0 µg/l
Corticosterone	0,175 µg/l	100 µg/l	100 µg/l
Cortisolo	1,52 µg/l	521 µg/l	600 µg/l
Cortisone	0,148 µg/l	51,8 µg/l	80,0 µg/l
Deidroepiandrosterone (DHEA)	0,229 µg/l	120 µg/l	120 µg/l
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	24,4 µg/l	18000 µg/l	18000 µg/l
11-Deossicorticosterone	0,023 µg/l	6,00 µg/l	6,00 µg/l
11-Deossicortisolo	0,030 µg/l	30,0 µg/l	30,0 µg/l
21-Deossicortisolo	0,027 µg/l	10,0 µg/l	10,0 µg/l
Diidrotosterone	0,042 µg/l*	3,00 µg/l	3,00 µg/l
Estradiolo	0,025 µg/l*	10,0 µg/l	10,0 µg/l
17α-Ildrossiprogesterone	0,040 µg/l	30,0 µg/l	30,0 µg/l
Progesterone	0,030 µg/l	25,0 µg/l	45,0 µg/l
Testosterone	0,005 µg/l	24,0 µg/l	24,0 µg/l

*Nei campioni dei pazienti il LLOQ può differire dal valore indicato poiché la composizione della matrice varia da individuo a individuo.

Tabella 33: Linearità e limite di quantificazione, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S

Sostanza	Limite di quantificazione	Intervallo di linearità fino ad almeno	
		siero	plasma
Aldosterone	0,025 µg/l	6,00 µg/l	6,00 µg/l
Androstenedione	0,010 µg/l	30,0 µg/l	30,0 µg/l
Corticosterone	0,048 µg/l	100 µg/l	100 µg/l
Cortisolo	0,966 µg/l	600 µg/l	600 µg/l
Cortisone	0,050 µg/l	80,0 µg/l	80,0 µg/l
Deidroepiandrosterone (DHEA)	0,500 µg/l	120 µg/l	120 µg/l
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	13,0 µg/l	18000 µg/l	18000 µg/l
11-Deossicorticosterone	0,043 µg/l	6,00 µg/l	6,00 µg/l
11-Deossicortisolo	0,068 µg/l	30,0 µg/l	30,0 µg/l
21-Deossicortisolo	0,046 µg/l	10,0 µg/l	10,0 µg/l
Diidrotosterone	0,043 µg/l*	3,00 µg/l	3,00 µg/l
Estradiolo	0,024 µg/l*	10,0 µg/l	10,0 µg/l
17α-Ildrossiprogesterone	0,044 µg/l	30,0 µg/l	30,0 µg/l
Progesterone	0,035 µg/l	50,0 µg/l	50,0 µg/l
Testosterone	0,012 µg/l	24,0 µg/l	24,0 µg/l

* Nei campioni dei pazienti, il LLOQ può differire dal valore indicato poiché la composizione della matrice varia da individuo a individuo.

Riproducibilità intra-assay

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso preparazioni ripetute (n = 10) dello stesso campione di siero a tre diverse concentrazioni nella stessa sequenza.

Tabella 34: Riproducibilità intra-assay, determinazione con spettrometro di massa SCIEX QTRAP® 5500

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
Aldosterone	1,9 % (0,101 µg/l)	0,9 % (0,251 µg/l)	1,1 % (1,01 µg/l)
Androstenedione	1,9 % (0,287 µg/l)	2,0 % (1,13 µg/l)	1,2 % (9,44 µg/l)
Corticosterone	2,3 % (0,837 µg/l)	2,3 % (4,08 µg/l)	2,0 % (29,0 µg/l)
Cortisolo	1,9 % (27,8 µg/l)	1,1 % (65,5 µg/l)	0,9 % (190 µg/l)
Cortisone	1,8 % (2,03 µg/l)	1,3 % (11,6 µg/l)	0,9 % (28,9 µg/l)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	2,4 % (1,97 µg/l)	1,5 % (12,2 µg/l)	2,2 % (39,6 µg/l)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	1,6 % (227 µg/l)	0,9 % (1384 µg/l)	0,7 % (4696 µg/l)
11-Deossicorticosterone	3,8 % (0,078 µg/l)	2,0 % (0,195 µg/l)	2,2 % (0,968 µg/l)
11-Deossicortisolo	2,3 % (0,284 µg/l)	2,1 % (1,42 µg/l)	1,9 % (9,49 µg/l)
21-Deossicortisolo	6,2 % (0,094 µg/l)	3,4 % (0,373 µg/l)	2,5 % (2,31 µg/l)
Diidrotosterone	3,5 % (0,081 µg/l)	1,8 % (0,363 µg/l)	2,0 % (1,13 µg/l)
Estradiolo	7,2 % (0,087 µg/l)	4,6 % (0,409 µg/l)	6,0 % (2,56 µg/l)
17α-Irossiprogesterone	1,7 % (0,313 µg/l)	0,8 % (1,57 µg/l)	1,2 % (9,26 µg/l)
Progesterone	1,1 % (0,320 µg/l)	1,4 % (2,94 µg/l)	0,8 % (14,5 µg/l)
Testosterone	1,4 % (0,202 µg/l)	0,8 % (1,48 µg/l)	0,6 % (7,78 µg/l)

Tabella 35: Riproducibilità intra-assay, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
Aldosterone	2,7 % (0,101 µg/l)	2,0 % (0,251 µg/l)	1,8 % (1,01 µg/l)
Androstenedione	1,3 % (0,287 µg/l)	1,3 % (1,13 µg/l)	1,2 % (9,44 µg/l)
Corticosterone	3,0 % (0,837 µg/l)	2,4 % (4,08 µg/l)	2,5 % (29,0 µg/l)

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
Cortisolo	1,6 % (27,8 µg/l)	1,4 % (65,5 µg/l)	1,2 % (190 µg/l)
Cortisone	1,4 % (2,03 µg/l)	1,0 % (11,6 µg/l)	1,6 % (28,9 µg/l)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	2,0 % (1,97 µg/l)	2,2 % (12,2 µg/l)	2,0 % (39,6 µg/l)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	1,6 % (243 µg/l)	0,8 % (1417 µg/l)	0,5 % (4770 µg/l)
11-Deossicorticosterone	2,2 % (0,078 µg/l)	2,6 % (0,195 µg/l)	1,5 % (0,968 µg/l)
11-Deossicortisolo	2,6 % (0,284 µg/l)	2,8 % (1,42 µg/l)	2,7 % (9,49 µg/l)
21-Deossicortisolo	5,4 % (0,094 µg/l)	4,0 % (0,373 µg/l)	4,3 % (2,31 µg/l)
Diidrotosterone	2,3 % (0,081 µg/l)	1,6 % (0,363 µg/l)	1,4 % (1,13 µg/l)
Estradiolo	5,9 % (0,087 µg/l)	7,7 % (0,409 µg/l)	3,3 % (2,56 µg/l)
17 α -Idrossiprogesterone	1,2 % (0,313 µg/l)	1,8 % (1,57 µg/l)	1,2 % (9,26 µg/l)
Progesterone	1,5 % (0,320 µg/l)	0,9 % (2,94 µg/l)	1,2 % (14,5 µg/l)
Testosterone	1,4 % (0,202 µg/l)	1,6 % (1,48 µg/l)	0,8 % (7,78 µg/l)

Riproducibilità inter-assay

La riproducibilità inter-assay è stata ricavata attraverso la preparazione ripetuta (n = 5) dello stesso campione di siero a tre concentrazioni diverse in 20 giorni diversi.

Tabella 36: Riproducibilità inter-assay, determinazione con spettrometro di massa SCIEX QTRAP® 5500

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
Aldosterone	5,9 % (0,101 µg/l)	5,2 % (0,251 µg/l)	3,9 % (1,01 µg/l)
Androstenedione	8,2 % (0,287 µg/l)	7,2 % (1,13 µg/l)	5,9 % (9,44 µg/l)
Corticosterone	6,0 % (0,837 µg/l)	4,6 % (4,08 µg/l)	3,9 % (29,0 µg/l)
Cortisolo	5,0 % (27,8 µg/l)	4,0 % (65,5 µg/l)	3,8 % (190 µg/l)
Cortisone	5,6 % (2,03 µg/l)	3,6 % (11,6 µg/l)	3,7 % (28,9 µg/l)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	7,5 % (1,97 µg/l)	4,6 % (12,2 µg/l)	4,9 % (39,6 µg/l)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	6,9 % (227 µg/l)	4,9 % (1384 µg/l)	4,1 % (4696 µg/l)

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
11-Deossicorticosterone	9,7 % (0,078 µg/l)	5,5 % (0,195 µg/l)	4,2 % (0,968 µg/l)
11-Deossicortisol	6,3 % (0,284 µg/l)	4,7 % (1,42 µg/l)	4,6 % (9,49 µg/l)
21-Deossicortisol	10,6 % (0,094 µg/l)	5,4 % (0,373 µg/l)	4,4 % (2,31 µg/l)
Diidrotosterone	11,0 (0,081 µg/l)	4,9 % (0,363 µg/l)	5,0 % (1,13 µg/l)
Estradiolo	14,0 % (0,087 µg/l)	8,2 % (0,409 µg/l)	8,4 % (2,56 µg/l)
17 α -Idrossiprogesterone	9,5 % (0,313 µg/l)	4,2 % (1,57 µg/l)	3,8 % (9,26 µg/l)
Progesterone	10,2 % (0,320 µg/l)	4,5 % (2,94 µg/l)	5,9 % (14,5 µg/l)
Testosterone	8,9 % (0,202 µg/l)	4,5 % (1,48 µg/l)	4,5 % (7,78 µg/l)

Tabella 37: Riproducibilità inter-assay, determinazione con spettrometro di massa Waters® Xevo™ TQ-S

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
Aldosterone	5,1 % (0,101 µg/l)	4,5 % (0,251 µg/l)	4,7 % (1,01 µg/l)
Androstenedione	9,6 % (0,287 µg/l)	4,8 % (1,13 µg/l)	4,6 % (9,44 µg/l)
Corticosterone	7,1 % (0,837 µg/l)	4,8 % (4,08 µg/l)	4,1 % (29,0 µg/l)
Cortisol	5,0 % (27,8 µg/l)	3,4 % (65,5 µg/l)	3,1 % (190 µg/l)
Cortisone	5,6 % (2,03 µg/l)	3,8 % (11,6 µg/l)	3,5 % (28,9 µg/l)
Deidroepiandrosterone (DHEA)	8,5 % (1,97 µg/l)	5,5 % (12,2 µg/l)	5,1 % (39,6 µg/l)
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	6,7 % (243 µg/l)	4,3 % (1417 µg/l)	4,1 % (4770 µg/l)
11-Deossicorticosterone	9,2 % (0,078 µg/l)	5,1 % (0,195 µg/l)	3,9 % (0,968 µg/l)
11-Deossicortisol	5,5 % (0,284 µg/l)	4,1 % (1,42 µg/l)	3,9 % (9,49 µg/l)
21-Deossicortisol	10,5 % (0,094 µg/l)	6,6 % (0,373 µg/l)	5,4 % (2,31 µg/l)
Diidrotosterone	10,6 % (0,081 µg/l)	5,3 % (0,363 µg/l)	4,9 % (1,13 µg/l)
Estradiolo	13,6 % (0,087 µg/l)	8,7 % (0,409 µg/l)	7,1 % (2,56 µg/l)

Sostanza	Coefficiente di variazione (concentrazione della sostanza)		
17 α -Idrossiprogesterone	9,1 % (0,313 μ g/l)	4,0 % (1,57 μ g/l)	3,8 % (9,26 μ g/l)
Progesterone	11,7 % (0,320 μ g/l)	5,4 % (2,94 μ g/l)	5,4 % (14,5 μ g/l)
Testosterone	8,8 % (0,202 μ g/l)	4,1 % (1,48 μ g/l)	4,2 % (7,78 μ g/l)

Questi dati sono stati ricavati nei nostri laboratori, esclusivamente per la verifica delle prestazioni del kit di reagenti e al fine di garantire l'osservanza delle norme di validazione. Si avvisa esplicitamente che tali dati non sono adatti a confrontare i sistemi di validazione utilizzati e a trarre conclusioni sulle loro capacità di prestazione in generale.

Drift

Per la definizione del drift della concentrazione degli analiti nel tempo è stata messa a confronto per un periodo di 20 giorni la concentrazione di tutti gli analiti nei tre controlli utilizzati. Questo test è stato eseguito con tre diversi sistemi LC-MS/MS (SCIEX QTRAP® 5500, Waters® Xevo™ TQ-S). Non è stato osservato alcun drift per nessun analita.

Carry-Over (contaminazione)

Immediatamente dopo alla misurazione dello standard di calibrazione con la più elevata concentrazione di analita è stato iniettato il bianco, confrontando le aree dei picchi di entrambi. Il test è stato effettuato su un SCIEX QTRAP® 5500. Dalla verifica dei dati ricavati, per tutti e quattro gli analiti non risultano effetti di carry-over. Per tutte le misurazioni, la concentrazione del bianco si situava al di sotto del limite di rivelazione.

Copy

EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12

82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the LC-MS/MS determination of:

Nomenclature term: Other Fertility Function Hormones

Nomenclature code: 12-05-01-90-00

Classification: other product

Product name: **MassChrom**[®] Steroids in serum/plasmaCalibrators: **6PLUS1**[®] Multilevel Serum Calibrator Set **MassChrom**[®] Steroid Panel 1**6PLUS1**[®] Multilevel Serum Calibrator Set **MassChrom**[®] Steroid Panel 2Controls: **MassCheck**[®] Steroid Panel 1 Serum Control Level I**MassCheck**[®] Steroid Panel 1 Serum Control Level II**MassCheck**[®] Steroid Panel 1 Serum Control Level III**MassCheck**[®] Steroid Panel 2 Serum Control Level I**MassCheck**[®] Steroid Panel 2 Serum Control Level II**MassCheck**[®] Steroid Panel 2 Serum Control Level III

meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

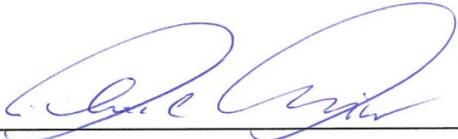
Conformity assessment procedure: Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:

EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 23640,
EN 13641

Notified body: -

Gräfelfing, December 04, 2017



Michael Meier, Managing Director

Vers. 1.0

[Traduzione]

Dichiarazione di conformità

ai sensi della direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro

Noi, come produttore,

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing, Germania

dichiariamo sotto la propria responsabilità che i sottocitati prodotti per la diagnostica in-vitro per la determinazione LC-MS/MS

Denominazione nomenclatura: Other Fertility Function Hormones
Codice nomenclatura: 12-05-01-90-00
Classificazione: *altro dispositivo*

Denominazione prodotto: **MassChrom®** Steroidi in siero/plasma

Standard di calibrazione: **6PLUS1®** Multilevel Serum Calibrator Set **MassChrom®** Steroid Panel 1
6PLUS1® Multilevel Serum Calibrator Set **MassChrom®** Steroid Panel 2

Controlli: **MassCheck®** Steroid Panel 1 Serum Control Level I
MassCheck® Steroid Panel 1 Serum Control Level II
MassCheck® Steroid Panel 1 Serum Control Level III
MassCheck® Steroid Panel 2 Serum Control Level I
MassCheck® Steroid Panel 2 Serum Control Level II
MassCheck® Steroid Panel 2 Serum Control Level III

sono conformi ai requisiti della direttiva 98/79 CE.

Procedura di valutazione della conformità:

Allegato III della direttiva 98/79 CE.

Norme armonizzate applicate:

EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 23640, EN 13641

Organismo notificato:-

Gräfelfing, 04 dicembre 2017

M. Meier
Amministratore delegato

Allegato V: Simboli

Le etichette, procedure e confezioni dei prodotti Chromsystems utilizzano simboli ai sensi della norma EN ISO 15223-1, il cui significato è descritto nella seguente tabella:

Tabella 38: Simboli

Simboli	Significato
	Produttore
	Utilizzabile fino
	Codice articolo
	Lotto
	Osservare le istruzioni per l'uso!
	Limite di temperatura superiore: Conservare a temperature inferiori al valore indicato
	Intervallo di temperatura: Conservare a temperature all'interno di un intervallo definito
	Diagnostica <i>in-vitro</i>