



Instructions for Use

Free Testosterone ELISA

IVD



REF EIA-2924

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas	
<p>The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior:</p>	
<p>Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters. Change to a new microtiter plate.</p>	
1 INTENDED PURPOSE	Elaboration on existing to indicate clinical use of the product
1.1 CLINICAL SIGNIFICANCE	Updated with new references
2 PRINCIPLE OF THE METHOD	Additional information added for clarification
7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	Additional information added for clarification
9 QUALITY CONTROL	Updated
10 CALCULATION OF RESULTS	Additional information added for clarification
11 MEASURING RANGE	Changed from 0.2 – 100 pg/mL to 0.34 to 70 pg/mL. Previous measuring range was based on analytical sensitivity to top calibrator; updated range is based on limit of quantitation to upper limit of linearity
13 EXPECTED VALUES	Updated values based on the results of a new study being performed.
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	Update due to the validation study performed on the assay following the plate change. Addition of new data.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED PURPOSE	4
2	PRINCIPLE OF THE METHOD	4
3	REAGENTS, MATERIALS, AND INSTRUMENTATION	5
4	WARNINGS	5
5	PRECAUTIONS	5
6	REAGENT STORAGE AND STABILITY	6
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	6
8	PROCEDURE	6
9	QUALITY CONTROL	7
10	CALCULATION OF RESULTS	7
11	MEASURING RANGE	8
12	METROLOGY AND TRACEABILITY	8
13	EXPECTED VALUES	8
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
15	LIMITATIONS OF USE	10
16	WASTE MANAGEMENT	10
17	REPORTING OF SERIOUS INCIDENT	10
1	ZWECKBESTIMMUNG	11
2	TESTPRINZIP	11
3	REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	11
4	WARNHINWEISE	11
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	12
6	LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN	12
7	ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN	12
8	DURCHFÜHRUNG	13
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
10	MESSBEREICH	14
11	METROLOGIE UND RÜCKVERFOLGBARKEIT	14
12	ERWARTETE WERTE	14
13	LEISTUNGSMERKMALE	14
14	GRENZEN DER ANWENDUNG	14
15	ENTSORGUNG	14
16	MELDUNG VON SCHWERWIEGENDEN VORKOMMNISSEN	14
1	DESTINAZIONE D'USO (INTENDED PURPOSE)	15
2	PRINCIPIO DEL METODO	15
3	REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	16
4	AVVERTENZE	16
5	PRECAUZIONI	16
6	CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI	17
7	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	17
8	PROCEDURA	17
9	CONTROLLO QUALITÀ	18
10	CALCOLO DEI RISULTATI	18
11	INTERVALLO DI MISURAZIONE	19
12	METROLOGIA E TRACCIABILITÀ	19
13	VALORI ATTESI	19
14	CARATTERISTICHE DI AZIONE	19
15	LIMITAZIONI D'USO	21
16	GESTIONE DEI RIFIUTI	21
17	SEGNALAZIONE DI INCIDENTI GRAVI	21

1	FINALIDAD PREVISTA (INTENDED PURPOSE).....	22
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO	22
3	REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN.....	23
4	ADVERTENCIAS	23
5	PRECAUCIONES.....	23
6	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS	24
7	RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	24
8	PROCEDIMIENTO	24
9	CONTROL DE CALIDAD	25
10	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	26
11	RANGO DE MEDICIÓN	26
12	METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD	26
13	VALORES ESPERADOS	26
14	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	26
15	LÍMITES DE USO.....	28
16	GESTIÓN DE RESIDUOS	28
17	INFORMACIÓN DE INCIDENTES GRAVES	28
18	BIBLIOGRAPHY.....	29
19	SYMBOLS USED.....	30

1 INTENDED PURPOSE

Free Testosterone ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of free testosterone in human serum or plasma.

Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis and monitoring of disorders involving the male sex hormones (androgens).

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

1.1 CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone is found in circulation predominantly linked to carrier proteins, the most common of which being sex-hormone binding globulin (SHBG). Testosterone plays a key role in the development of primary and secondary sexual characteristics in males and is involved in the production of female sexual hormones.

Only 1 – 2% of testosterone in circulation is not bound to any protein and is biologically active – this is referred to as ‘free testosterone’ (FT). Bioavailable testosterone refers to the sum of FT and the testosterone bound to serum albumin, since it is bound with low affinity and readily able to dissociate to become available for its biological function.

In males elevated levels of testosterone are associated with several conditions such as, early (precocious) puberty, congenital adrenal hyperplasia (CAH), androgen insensitivity syndrome (AIS), steroid use and testicular or adrenal tumours. Whereas the major causes of suppressed levels include Klinefelter’s syndrome, testicular damage, pituitary disorders etc. In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilising conditions including adrenal tumours and polycystic ovarian syndrome (PCOS).

These clinical conditions are associated with either a lack or excess of testosterone in circulation (hypoandrogenism or hyperandrogenism). Diagnosis of these disorders involve the quantification of total testosterone (TT) in association with other clinical evidence and laboratory data. However, clinical manifestations of androgen disorders are often associated with normal levels of TT. In such cases, additional information may be gained by the assessment of the biologically active, FT level. Several androgen disorders can be caused by alteration of SHBG production which affects the levels of FT available in serum.

Measurement of FT can be considered useful in the diagnosis of several conditions including androgen deficiency in men and androgen excess in women¹. Assessment of free testosterone levels may prove beneficial² and may avoid an incorrect diagnosis of hypogonadism in cases when low concentrations of total testosterone are determined and alterations of SHBG are suspected.

There is an observed and well documented circadian variation of testosterone levels in men with circulating concentrations being higher in the morning and declining throughout the day³. Testosterone levels also decline in ageing males (andropause) and is associated with loss of muscle and bone mass, leading to osteoporosis, loss of libido, erectile dysfunction. Depression and impaired cognitive function⁴.

2 PRINCIPLE OF THE METHOD

The Free Testosterone ELISA is a competitive enzyme immunoassay (ELISA) where free testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti-testosterone coated on the microplate (solid phase).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is inversely proportional to the free testosterone concentration of in the sample.

Free testosterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3 REAGENTS, MATERIALS, AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. **Standards (Standard 0 – 5)** (6 vials, 1 mL each)
2. **Controls** (Control A and Control B) (2 vials, 1 mL)
Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis
3. **Enzyme Conjugate** (1 vial, 15 mL)
Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
4. **Microtiterwells** (1 breakable microplate)
Anti-Testosterone antibody adsorbed on microplate
5. **Substrate Solution** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)
6. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 M (*avoid any skin contact*)
7. **Wash Solution**, 10X Conc. (2 vials, 25 mL)
0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

3.2 Materials required but not provided

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

4 WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in humans or animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV, or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which is harmful if inhaled, ingested, or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals, or oxidants. Do not freeze the solution.
- The clinical significance of the determination of free testosterone can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 °C - 8 °C in the dark.

- The kit is stable at 2 °C - 8 °C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 °C - 8 °C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 °C - 8 °C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using

serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or **plasma** (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 °C - 8 °C	24 hours
Freeze/thaw cycles	1 cycle

8 PROCEDURE

8.1 Preparation of Standards and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The Standards are ready for use and have the following concentration of Testosterone:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	0.2	1.0	4.0	20.0	100.0

8.2 Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the two vials "*Wash Solution*" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use (for both vials, 25 mL + 25 mL + 450 mL).

For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

8.3 Preparation of Samples

The determination of free testosterone can be performed in human serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

The Controls are ready to use.

8.4 Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 °C - 8 °C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (S0 - S5), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample / Control	Blank
Standard S0-S5	20 µL		
Sample / Control		20 µL	
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at 37 °C for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature 22 °C – 28 °C for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

9 QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DRG recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁵.

10 CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls.

A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Standard 0 is required.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

Conversion of units

To convert results to SI units:

$$\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3.47$$

To convert results to mass units:

$$\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0.289$$

11 MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 0.34 – 70.0 pg/mL (1.18 – 242.9 pmol/L).

Any value that reads below 0.34 pg/mL (1.18 pmol/L) should be reported as “< 0.34 pg/mL (< 1.18 pmol/L)”.

Any value that reads above 70.0 pg/mL (242.9 pmol/L) should be reported as “> 70.0 pg/mL (242.9 pmol/L)”.

12 METROLOGY AND TRACEABILITY

The Free Testosterone ELISA has been standardised against internal reference standards (serum matrix) which have been value assigned to another commercially available test method.

13 EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Free Testosterone ELISA and are provided for information only.

	No. of subjects	Median pg/mL	Reference Interval (pg/mL)
Males			
21 – 49 years	120	14.13	5.01 – 27.78
> 50 years	120	12.75	4.11 – 21.85
Females			
pre-menopausal	120	0.55	< LOQ – 1.70
post-menopausal	120	0.75	< LOQ – 2.34

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

14.1 Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.10 pg/mL
Limit of Detection (LoD)	0.20 pg/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	0.34 pg/mL

14.2 Trueness

Trueness has been demonstrated through method comparison of the Free Testosterone ELISA to a commercially available assay using native donor samples – refer to section 15.5

14.3 Precision

Precision of the Free Testosterone ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once per day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	0.68	0.08	11.3%
2	75	1.62	0.10	5.9%
3	75	5.25	0.19	3.7%
4	75	10.43	0.48	4.6%
5	75	34.99	1.17	3.3%
6	75	68.65	4.62	6.7%

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once per day for 5 days by 3 operators.

Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	0.75	0.14	18.0%
2	150	1.74	0.24	14.1%
3	150	5.48	0.52	9.4%
4	150	10.72	0.94	8.7%
5	150	37.41	4.83	12.9%
6	150	73.81	10.83	14.7%

14.4 Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures".

For free testosterone concentration by Free Testosterone ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 0.27 to 89.83 pg/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

14.5 Method comparison

The Free Testosterone ELISA was compared against a commercially available quantitative manual ELISA test, following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 95 samples, selected to represent a wide range of free testosterone concentrations, was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
95	0.94 [0.88 to 0.99]	-0.02 [-0.14 to 0.06]	0.93

14.6 Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross-reactant	Concentration tested	Mean %Cross reactivity
11-keto-testosterone	100 ng/mL	0.1%
11- β -hydroxy-testosterone	10 ng/mL	0.2%
17 α OH-Progesterone	500 ng/mL	0.0%
Aldosterone	3000 ng/mL	0.0%
Androstenedione	100 ng/mL	0.0%
Cortisol	1000 ng/mL	0.0%
Cortisone	1000 ng/mL	0.0%
Danazol	1000 ng/mL	0.0%
Dexamethasone	2000 ng/mL	0.0%
DHEA	1000 ng/mL	0.0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0.0%

Cross-reactant	Concentration tested	Mean %Cross reactivity
5a-dihydrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0.0%
Estradiol	1000 ng/mL	0.0%
Estriol	100 ng/mL	0.0%
Estrone	1000 ng/mL	0.0%
Ethisterone	100 ng/mL	0.0%
Norgestrel	100 ng/mL	0.0%
Prednisone	1000 ng/mL	0.0%
Pregnenolone	5000 ng/mL	0.0%
Progesterone	1000 ng/mL	0.0%
Testosterone propionate	1000 ng/mL	0.0%

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Free Testosterone ELISA when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	7 g/dL
Triglyceride	500 mg/dL

14.7 Serum-plasma study

The Free Testosterone ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 21 samples (18 native, 3 spiked) to cover the range were evaluated. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	0.97 [0.92 to 1.02]	-0.02 [-1.01 to 0.98]	0.99
Lithium Heparin	0.99 [0.97 to 1.02]	-0.01 [-0.40 to 1.02]	1.00
Sodium Heparin	0.93 [0.87 to 0.99]	-0.01 [-1.12 to 1.10]	0.99
EDTA	1.03 [0.97 to 1.08]	0.27 [0.74 to 1.28]	0.99

15 LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁶. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

16 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

17 REPORTING OF SERIOUS INCIDENT

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der Free Testosterone ELISA ist ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung von freiem Testosteron in Humanserum oder -plasma.

Die Ergebnisse sind in Verbindung mit anderen Daten aus Klinik und Labor als Hilfsmittel für die Diagnose und Überwachung von Erkrankungen zu verwenden, die mit den männlichen Geschlechtshormonen (Androgenen) zusammenhängen.

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik.

Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

2 TESTPRINZIP

Der Free Testosterone ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay, bei dem das freie Testosteron (Antigen) in der Probe mit an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundenem Testosteron-Antigen im Konjugat um die Anlagerung an die Anti-Testosteron-Antikörper auf der Mikrotiterplatte (feste Phase) konkurriert.

Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt.

Dann reagiert das Enzym HRP in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H_2SO_4) hinzugefügt wird.

Die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Testosterons in der Probe.

Die Konzentration des freien Testosterons in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

3 REAGENZIEEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. **Standards (Standard 0 – 5)**, (6 Fläschchen, je 1 mL)
2. **Controls (Kontrollen)**, Control A und Control B) (2 Fläschchen, 1 mL)
Die Konzentration der Kontrollen ist auf dem Analysenzertifikat angegeben
3. **Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat)** (1 Fläschchen, 15 mL)
Testosteron konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
4. **Microtiterwells (1 Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen)**
Anti-Testosteron-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden
5. **TMB Substrate Solution (TMB-Substratlösung)** (1 Fläschchen, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (*Hautkontakt vermeiden*)
6. **Stop Solution (Stopplösung)** (1 Fläschchen, 15 mL)
Schwefelsäure 0,15 M (*Hautkontakt vermeiden*)
7. **Wash Solution (Waschlösung)** 10-fach konzentriert (2 Fläschchen, 25 mL)
0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Dispenser

Präzisionspipetten

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620-630 nm)

4 WARNHINWEISE

- Dieses Kit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Die humanen Ausgangsmaterialien für die Produktion der Reagenzien dieses Produkts wurden auf Antikörper gegen HIV 1&2, HBsAg und HCV getestet und waren negativ. Jedoch kann durch keine Testmethode das Vorhandensein von HIV, HBV, HCV oder anderer infektiöser Krankheitserreger mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Deshalb sollten Standards und Kontrollen als potenziell infektiös betrachtet und entsprechend behandelt werden.

- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an ProClin 300™ als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Die Bestimmung des freien Testosterons hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit Kortison oder natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C - 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet.
- Vor der Verwendung müssen alle Kit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Kit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Die auf den Etiketten des Kartons und der Fläschchen angegebenen Verfalldaten müssen eingehalten werden. Die Kit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Bei Verwendung von automatischen Geräten unterliegt es der Verantwortung des Benutzers zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken.
Um die Kit-Performance bei der Verwendung von automatischen ELISA-Systemen zu verbessern, wird empfohlen, die Anzahl der Waschschrte zu erhöhen.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Den Kit bei 2 °C – 8 °C im Dunkeln lagern.

- Der Kit ist bei 2 °C - 8 °C bis zu dem auf dem Außenetikett des Kits angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach dem Öffnen ist der Kit bei 2 °C - 8 °C für 6 Monate haltbar.
- Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C - 8 °C gelagert 30 Tage lang haltbar.

Wichtiger Hinweis: Den Beutel mit der beschichteten Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

7 ENTNAHME UND LAGERUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

- **Serum** (Standardprobenröhrchen oder Röhrchen mit Seruntrenngel) oder
- **Plasma** (Lithiumheparin, Natriumheparin oder Kalium-EDTA).

Probenlagerung	Dauer
2 °C - 8 °C	24 h
Einfrier-/Auftauzyklen	1 Zyklus

8 DURCHFÜHRUNG

8.1 Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Vor der Verwendung 5 Minuten mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

Die Standards sind gebrauchsfertig und haben die folgenden Testosteronkonzentrationen:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

8.2 Vorbereitung der Waschlösung

Vor der Verwendung muss der Inhalt der beiden Fläschchen der „Wash Solution“ mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 mL (bezogen auf beide Fläschchen: 25 mL + 25 mL + 450 mL) verdünnt werden.

Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:10 verdünnen.

Möglicherweise sind in der konzentrierten Waschlösung Kristalle sichtbar, in diesem Fall bei Raumtemperatur mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben. Um die Genauigkeit zu erhöhen, den gesamten Inhalt der beiden Flaschen mit konzentrierter Waschlösung auf 500 mL auffüllen und dabei darauf achten, dass auch die Kristalle mit übertragen werden, anschließend mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben.

8.3 Vorbereitung der Proben

Die Bestimmung des freien Testosterons kann in Humanserum (Standardprobenröhrchen oder Röhrchen mit Serumentrenngel) oder Plasma (Lithiumheparin, Natriumheparin oder Kalium-EDTA) durchgeführt werden.

Die Kontrolle ist gebrauchsfertig.

8.4 Testdurchführung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen (22 °C - 28 °C, mindestens 30 Minuten). Nach Beendigung des Tests Reagenzien sofort bei 2 °C - 8 °C lagern: lange Einwirkungszeit von Raumtemperatur vermeiden.

Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigegefügteten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, überschüssige Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.

Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (S0 - S5) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Probe/ Kontrolle	Nullwert
Standard S0-S5	20 µL		
Probe / Kontrolle		20 µL	
Enzymkonjugat	100 µL	100 µL	
1 Stunde bei +37 °C inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen; die Vertiefungen dreimal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen.			
Wichtiger Hinweis: Die Mikrotiterplatte während jedes Waschschriffs 5 Sekunden lang vorsichtig schütteln und anschließend die umgedrehte Mikrotiterplatte auf ein saugfähiges Papiertuch schlagen, um Rückstände der Waschlösung zu entfernen.			
Automatisches Waschgerät: Bei Verwendung von automatischen Geräten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substratlösung	100 µL	100 µL	100 µL
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Extinktion (E) innerhalb von 5 min bei 450 nm gegen eine Referenz-Wellenlänge von 620-630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Es stehen verschiedene Softwarepakete zur Datenreduktion zur Verfügung, die zur Erstellung der Standardkurve und zur Berechnung der Konzentrationen der unbekanntenen Proben und Kontrollen verwendet werden können.

Eine logistische 4-Parameter-Kurvenanpassung (4PL), **die Standard 0 einschließt**, ist erforderlich.

Alternativ kann eine Kalibrierkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier erstellt werden, indem die mittlere Absorption auf der Y-Achse gegen die Konzentration des Analyten auf der X-Achse aufgetragen wird. Der Standard 0 sollte in der Kalibrierkurve enthalten sein. Lesen Sie den mittleren Absorptionswert jeder unbekanntenen Probe an der Kurve ab.

Umrechnung von Einheiten

Umrechnung der Ergebnisse in SI-Einheiten: $\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3,47$

Zur Umrechnung der Ergebnisse in Masseneinheiten: $\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$

10 MESSBEREICH

Der Assay-Messbereich beträgt 0,34 – 70,0 pg/mL (1,18 – 242,9 pmol/L).

Jeder Wert, der unter 0,34 pg/mL (1,18 pmol/L) liegt, sollte als "< 0,34 pg/mL (< 1,18 pmol/L)" angegeben werden.

Jeder Wert, der über 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L) liegt, sollte als "> 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L)" angegeben werden.

11 METROLOGIE UND RÜCKVERFOLGBARKEIT

Der Free Testosterone ELISA wurde anhand interner Referenzstandards (Serummatrix) standardisiert, deren Werte einer anderen im Handel erhältlichen Testmethode zugeordnet wurden.

12 ERWARTETE WERTE

Die folgenden Bereiche wurden mit dem Free Testosterone ELISA ermittelt und dienen nur zur Information.

	n	Median (pg/mL)	Referenzbereich (pg/mL)
Männer			
21 – 49 Jahre	120	14.13	5.01 – 27.78
> 50 Jahre	120	12.75	4.11 – 21.85
Frauen			
pre-menopausal	120	0.55	< LOQ – 1.70
post-menopausal	120	0.75	< LOQ – 2.34

Die oben genannten Bereiche sollten nur als Richtlinien betrachtet werden; es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen erwarteten Bereich auf der Grundlage seiner eigenen Patientenpopulation festlegt.

13 LEISTUNGSMERKMALE

Die Daten hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

14 GRENZEN DER ANWENDUNG

Wie bei jedem diagnostischen Verfahren müssen die Ergebnisse in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und anderen dem Arzt vorliegenden Informationen interpretiert werden.

Die Leistungsmerkmale dieses Assays wurden nicht in einer pädiatrischen Population ermittelt.

Heterophile Antikörper im Humanserum können mit Reagenz-Immunglobulinen reagieren und In-vitro-Immunoassays stören⁶. Bei Patienten, die routinemäßig mit Tieren oder tierischen Serumprodukten in Kontakt kommen, kann es zu dieser Interferenz kommen, und es können anomale Werte beobachtet werden.

15 ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

16 MELDUNG VON SCHWERWIEGENDEN VORKOMMNISSEN

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

1 DESTINAZIONE D'USO (INTENDED PURPOSE)

Free Testosterone ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa del testosterone libero nel siero o nel plasma umano.

I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio dei disturbi che riguardano gli ormoni sessuali maschili (androgeni).

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

1.1 RILEVANZA CLINICA

Il testosterone circolante si coniuga principalmente a proteine di trasporto, tra cui la più comune è la globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG). Il testosterone svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dei caratteri sessuali maschili primari e secondari ed è coinvolto nella produzione di ormoni sessuali femminili.

Solo l'1–2% del testosterone circolante non è legato ad alcuna proteina ed è biologicamente attivo; viene denominato "testosterone libero" (FT). Il testosterone biodisponibile si riferisce alla somma del FT e del testosterone legato alla sieralbumina, poiché è associata a bassa affinità e facilmente in grado di dissociarsi per diventare disponibile per la sua funzione biologica.

Nei soggetti di sesso maschile, livelli elevati di testosterone sono associati a diverse condizioni quali pubertà precoce, iperplasia surrenale congenita (CAH), sindrome da insensibilità agli androgeni (SIA), utilizzo di steroidi e tumori testicolari o surrenali. Mentre le cause principali della soppressione del testosterone includono la sindrome di Klinefelter, danni ai testicoli, disturbi della ghiandola ipofisaria, ecc. Ne soggetti di sesso femminile di qualsiasi età, livelli elevati di testosterone possono essere associati a una serie di condizioni virilizzanti, inclusi tumori surrenali e la sindrome dell'ovaio policistico (SOPC).

Queste condizioni cliniche sono associate a mancanza o eccesso di testosterone in circolazione (ipoandrogenismo o iperandrogenismo). La diagnosi di questi disturbi comporta la quantificazione del testosterone totale (TT) in associazione ad altre evidenze cliniche e dati di laboratorio. Tuttavia, le manifestazioni cliniche dei disturbi a carico degli androgeni sono spesso associate a livelli normali di TT. In questi casi, è possibile ottenere ulteriori informazioni dalla valutazione del livello di FT biologicamente attivo. Diversi disturbi a carico degli androgeni possono essere causati da un'alterazione della produzione di SHBG che influisce sui livelli di FT disponibili nel siero.

La misurazione di FT può essere considerata di utilità nella diagnosi di varie condizioni, tra cui la carenza di androgeni negli uomini e l'eccesso di tali ormoni nelle donne¹. La misurazione dei livelli di testosterone libero può essere utile² ed evitare un'errata diagnosi di ipogonadismo nei casi in cui sono stabilite basse concentrazioni di testosterone totale e si sospettano alterazioni della SHBG.

Nei soggetti di sesso maschile è stata osservata e ben documentata una variazione circadiana dei livelli di testosterone circolante, con maggiori concentrazioni al mattino e una progressiva diminuzione nel corso della giornata³. Una diminuzione dei livelli di testosterone si manifesta anche durante l'invecchiamento (andropausa) ed è associata alla perdita di massa muscolare e ossea, con conseguente osteoporosi, calo della libido, disfunzione erettile, depressione e deficit delle funzioni cognitive⁴.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Il test Free Testosterone ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui il testosterone libero (antigene) nel campione compete con il testosterone antigenico coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame al numero limitato di anticorpi anti testosterone rivestiti sulla micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H_2O_2) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone libero nel campione.

La concentrazione di testosterone libero nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

3 REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. **Standards (Standard 0 – 5)** (6 flaconi, 1 mL ciascuno)
2. **Control** (Control A and Control B) (2 flaconi, 1 mL ciascuno)
La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi
3. **Enzyme Conjugate** (1 flacone, 15 mL)
Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)
4. **Microtiterwells** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra
5. **TMB Substrate Solution** (1 flacone, 15mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
6. **Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 M (evitare il contatto con la pelle)
7. **Wash Solution** 10X Conc. (2 flaconi, 25 mL)
Tampone fosfato 0.2M pH 7,4

3.2 Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

3.3 Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Letto di micropiastre (450 nm, 620–630 nm)

4 AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso in vitro esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
- Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato testato e risultato negativo per gli anticorpi dell'HIV 1 e 2, HbsAg e HCV. Nessun metodo di prova, tuttavia, può offrire la completa garanzia che HIV, HBV, HCV o altri agenti infettivi siano assenti. Pertanto, i calibratori e i controlli devono essere manipolati allo stesso modo del materiale potenzialmente infettivo.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La Stop Solution consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- La rilevanza clinica della determinazione del testosterone libero può essere invalidata se il paziente è stato trattato con cortisone o steroidi naturali o sintetici.

5 PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2 °C - 8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente testato.

- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2 °C - 8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2 °C - 8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su

campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o **plasma** (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2 °C - 8 °C	24 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

8 PROCEDURA

8.1 Preparazione di calibratori e controlli

Prima dell'uso, mescolare per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

I calibratori sono pronti per l'uso e hanno la seguente concentrazione di testosterone:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

8.2 Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto delle due fiale "Wash Solution 10X Conc." con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso (25 mL + 25 mL + 450 mL).

Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

8.3 Preparazione dei campioni

La determinazione del testosterone libero può essere effettuata su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio) umano.

I controlli sono pronti per l'uso.

8.4 Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22–28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2 °C - 8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S0 - S5), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Standard	Campione / Controllo	Bianco
Standard S0-S5	20 µL		
Campione/Controllo		20 µL	
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37 °C. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente 22 °C - 28 °C, al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

9 CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DRG raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁵.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti.

È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il Standard 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione.

Conversione delle unità

Per convertire i risultati in unità SI: $\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3,47$

Per convertire i risultati in unità di massa: $\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$

11 INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del dosaggio (AMR) è 0,34 – 70,0 pg/mL (1,18 – 242,9 pmol/L).

Qualsiasi valore inferiore a 0,34 pg/mL (1,18 pg/L) deve essere refertato come "< 0,34 pg/mL (< 1,18 pmol/L)".

Qualsiasi valore superiore a 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L) deve essere refertato come "> 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L)".

12 METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il test Free Testosterone ELISA è stato standardizzato in base a standard interni di riferimento (matrice sierica) il cui valore è stato assegnato a un altro metodo di test disponibile in commercio.

13 VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando Free Testosterone ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo.

	N. di soggetti	Mediana (pg/mL)	Intervallo di riferimento (pg/mL)
Uomini			
21 – 49 anni	120	14,13	5,01 – 27,78
> 50 anni	120	12,75	4,11 – 21,85
Donne			
pre-menopausa	120	0,55	< LOQ – 1,70
post-menopausa	120	0,75	< LOQ – 2,34

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

14 CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

14.1 Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,10 pg/mL
Limite di rilevamento (LoD)	0,20 pg/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	0,34 pg/mL

14.2 Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso il confronto del test Free Testosterone ELISA con un test disponibile in commercio utilizzando campioni di donatori nativi. Fare riferimento alla sezione 15.5.

14.3 Precisione

La precisione del test Free Testosterone ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	0,68	0,08	11,3%
2	75	1,62	0,10	5,9%
3	75	5,25	0,19	3,7%
4	75	10,43	0,48	4,6%
5	75	34,99	1,17	3,3%
6	75	68,65	4,62	6,7%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	0,75	0,14	18,0%
2	150	1,74	0,24	14,1%
3	150	5,48	0,52	9,4%
4	150	10,72	0,94	8,7%
5	150	37,41	4,83	12,9%
6	150	73,81	10,83	14,7%

14.4 Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures".

Per la concentrazione di testosterone libero mediante il test Free Testosterone ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 0,27 a 89,83 pg/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

14.5 Confronto del metodo

Il test Free Testosterone ELISA è stato confrontato con un test quantitativo ELISA manuale disponibile in commercio, secondo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 95 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di testosterone libero. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
95	0,94 [da 0,88 a 0,99]	-0,02 [da -0,14 a 0,06]	0,93

14.6 Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
11-ketotestosterone	100 ng/mL	0,1%
11- β -idrossi-testosterone	10 ng/mL	0,2%
17 α OH-Progesterone	500 ng/mL	0,0%
Aldosterone	3.000 ng/mL	0,0%
Androstenedione	100 ng/mL	0,0%
Cortisolo	1.000 ng/mL	0,0%
Cortisone	1.000 ng/mL	0,0%
Danazolo	1.000 ng/mL	0,0%
Desametasone	2.000 ng/mL	0,0%
DHEA	1.000 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10.000 ng/mL	0,0%
5 α -diidrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0,0%
Estradiolo	1.000 ng/mL	0,0%

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
Estriolo	100 ng/mL	0,0%
Estrone	1.000 ng/mL	0,0%
Etisterone	100 ng/mL	0,0%
Norgestrel	100 ng/mL	0,0%
Prednisone	1.000 ng/mL	0,0%
Pregnenolone	5.000 ng/mL	0,0%
Progesterone	1.000 ng/mL	0,0%
Testosterone propionato	1.000 ng/mL	0,0%

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test Free Testosterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	7 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

14.7 Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Free Testosterone ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 21 campioni (18 nativi, 3 additivati) per coprire l'intervallo. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	0,97 [da 0,92 a 1,02]	-0,02 [da -1,01 a 0,98]	0,99
Litio eparina	0,99 [da 0,97 a 1,02]	-0,01 [da -0,40 a 1,02]	1,00
Sodio eparina	0,93 [da 0,87 a 0,99]	-0,01 [da -1,12 a 1,10]	0,99
EDTA	1,03 [da 0,97 a 1,08]	0,27 [da 0,74 a 1,28]	0,99

15 LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁶. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

16 GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

17 SEGNALAZIONE DI INCIDENTI GRAVI

Tutti gli incidenti gravi relativi a questo prodotto devono essere notificati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui l'utilizzatore e/o il paziente sono stabiliti.

1 FINALIDAD PREVISTA (INTENDED PURPOSE)

Free Testosterone ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la testosterona libre en suero o plasma humano.

Los resultados deben usarse conjuntamente con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar en el diagnóstico y la monitorización de trastornos en los que están implicadas las hormonas sexuales masculinas (andrógenos).

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

1.1 IMPORTANCIA CLÍNICA

La testosterona se encuentra en circulación predominantemente vinculada a las proteínas portadoras, siendo la más común de ellas la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona representa un papel fundamental en el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias en los hombres, y participa en la producción de las hormonas sexuales femeninas.

Solo 1-2 % de la testosterona en circulación no está vinculada a ninguna proteína y es activa desde el punto de vista biológico, lo que se denomina «testosterona libre» (FT). La testosterona biodisponible es la suma de la FT y de la testosterona vinculada a la albúmina sérica, ya que se une con baja afinidad y puede disociarse fácilmente con el fin de estar disponible para realizar su función biológica.

En los hombres, los niveles elevados de testosterona están asociados a diferentes afecciones como la pubertad temprana (precoz), la hiperplasia adrenal congénita (CAH), el síndrome de insensibilidad de los andrógenos (SIA), el uso de esteroides y los tumores testiculares o adrenales. Las principales causas de los niveles inhibidos son el síndrome de Klinefelter, las lesiones testiculares, los trastornos hipofisarios, etc. En las mujeres de todas las edades, los niveles elevados de testosterona pueden asociarse a diferentes afecciones virilizantes, como los tumores adrenales y el síndrome de ovario poliquístico (SOP).

Estas afecciones clínicas están asociadas a la falta o al exceso de testosterona en circulación (hipoandrogenismo o hiperandrogenismo). El diagnóstico de estos trastornos implica la cuantificación de la testosterona total (TT) en relación con otras pruebas clínicas y datos de laboratorio. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de los desequilibrios de los andrógenos se asocian con frecuencia a niveles normales de TT. En estos casos, se puede obtener información adicional mediante la evaluación del nivel de FT que está activo desde el punto de vista biológico. Varios desequilibrios de los andrógenos pueden ser causados por la alteración de la producción de SHBG, que afecta a los niveles de FT presentes en el suero.

La medición de FT puede considerarse útil en el diagnóstico de algunas afecciones como la deficiencia de andrógenos en hombres y el exceso de andrógenos en mujeres¹. La evaluación de los niveles de testosterona libre puede resultar beneficiosa² y evitar el diagnóstico incorrecto del hipogonadismo en casos en los que se determinan concentraciones bajas de testosterona total y se sospecha que hay variaciones en los niveles de SHBG.

Existe una variación circadiana observada y bien documentada de los niveles de testosterona en hombres donde la concentración en circulación es más alta por la mañana y disminuye a lo largo del día³. Los niveles de testosterona también disminuyen en hombres mayores (andropausia), lo cual se asocia a la pérdida de músculo y masa ósea, que produce osteoporosis, pérdida de libido y disfunción eréctil. Depresión y deterioro de la función cognitiva⁴.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Free Testosterone ELISA es un ensayo enzimático inmunométrico competitivo (ELISA) en el que la testosterona libre (antígeno) de la muestra compite con la testosterona antigénica conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al número limitado de anticuerpos anti-testosterona recubiertos en la microplaca (fase sólida).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de testosterona libre de la muestra.

La concentración de testosterona libre en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. **Standard (Standard 0 – 5)**, Estándares (STD) de testosterona libre (6 frascos, 1 mL cada uno)
2. **Control** (Control A y Control B) , (2 frascos, 1 mL cada uno)
La concentración del control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)
3. **Enzyme Conjugate**, Conjugado (1 frasco, 15 mL)
Testosterona conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)
4. **Microtiterwells** , Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)
Anti-testosterona absorbido en la microplaca
5. **TMB Substrate Solution**, Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/l) (evitar el contacto con la piel)
6. **Stop Solution**, Solución de interrupción (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)
7. **Wash Solution**, Solución de lavado conc. 10X (2 frascos, 25 mL)
0.2 M tampón fosfato, pH 7,4

3.2 Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

3.3 Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

4 ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
- Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos ha sido sometido a pruebas que han dado resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, el HbsAg y el VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los calibradores y los controles deben manejarse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La Stop Solution consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.
- La importancia clínica de la determinación de la testosterona libre puede quedar invalidada si el paciente fue tratado con cortisona o esteroides naturales o sintéticos.

5 PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 °C - 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente probado.

- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2 °C - 8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2 °C - 8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2 °C - 8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

7 RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de

suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o

plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2 °C - 8 °C	24 horas
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Preparación de estándares y controles

Antes de utilizarlos, mezclar durante 5 minutos con una batidora giratoria.

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen la siguiente concentración de testosterona:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

8.2 Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido de los dos viales « *Wash Solution, 10X Conc.* » con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo (25 mL + 25 mL + 450 mL).

Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

8.3 Preparación de las muestras

La determinación de la testosterona libre puede realizarse usando muestras de suero humano (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Los controles están listos para su uso.

8.4 Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2 °C - 8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2 °C - 8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (S0 - S5), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestra / Control	Blanco
Estándares S0-S5	20 µL		
Muestra/Control		20 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a +37 °C. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Si se utiliza un equipo automático , lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22 °C - 28°C), protegida de la luz.			
Solución de interrupción	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

9 CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DRG recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁵.

10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos.

Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el Standard 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Conversión de unidades

Para convertir los resultados a unidades del SI: $\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3,47$

Para convertir los resultados en unidades de masa: $\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$

11 RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 0,34 – 70,0 pg/mL (1,18 – 242,9 pmol/L).

Cualquier valor por debajo de 0,34 pg/ml (1,18 pmol/L) debería declararse como «< 0,34 pg/ml» («< 1,18 pmol/L»).

Cualquier valor por debajo de 70,0 pg/ml (242,9 pmol/L) debería declararse como «> 70,0 pg/ml (242,9 pmol/L)».

12 METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El Free Testosterone ELISA ha sido estandarizado con respecto a los estándares de referencia internos (matriz de suero), cuyo valor ha sido asignado a otro método de prueba disponible en el mercado.

13 VALORES ESPERADOS

Los siguientes rangos se determinaron usando Free Testosterone ELISA y se proporcionan solo con fines informativos.

	Número de sujetos	Mediana (pg/mL)	Intervalo de referencia (pg/mL)
Varones			
21 – 49 años	120	14,13	5,01 – 27,78
> 50 años	120	12,75	4,11 – 21,85
Mujeres			
premenopáusica	120	0,55	< LOQ – 1,70
postmenopáusica	120	0,75	< LOQ – 2,34

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

14 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

14.1 Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,10 pg/mL
Límite de detección (LoD)	0,20 pg/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	0,34 pg/mL

14.2 Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante la comparación del método Free Testosterone ELISA con un ensayo disponible en el mercado que utiliza muestras de donantes nativos; consulte la sección 15.5.

14.3 Precisión

La precisión de Free Testosterone ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Medio conc. (pg/mL)	Intrapueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	0,68	0,08	11,3 %
2	75	1,62	0,10	5,9 %
3	75	5,25	0,19	3,7 %
4	75	10,43	0,48	4,6 %
5	75	34,99	1,17	3,3 %
6	75	68,65	4,62	6,7 %

Reproducibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Medio conc. (pg/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	0,75	0,14	18,0 %
2	150	1,74	0,24	14,1 %
3	150	5,48	0,52	9,4 %
4	150	10,72	0,94	8,7 %
5	150	37,41	4,83	12,9 %
6	150	73,81	10,83	14,7 %

14.4 Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures».

Para la concentración de testosterona libre ELISA en Free Testosterone ELISA, el procedimiento de medición muestra linealidad para el intervalo de 0,27 a 89,83 pg/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

14.5 Comparación de métodos

La Free Testosterone ELISA se comparó con una prueba ELISA manual cuantitativa disponible en el mercado, siguiendo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método se realizó el ensayo de un total de 95 muestras, seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de testosterona libre. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablock en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
95	0,94 [0,88 a 0,99]	-0,02 [-0,14 a 0,06]	0,93

14.6 Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración probada	Promedio en % de reactividad cruzada
11-ceto-testosterona	100 ng/mL	0,1 %
11- β -hidroxi-testosterona	10 ng/mL	0,2 %
17 α OH-progesterona	500 ng/mL	0,0 %
Aldosterona	3000 ng/mL	0,0 %
Androstenediona	100 ng/mL	0,0 %
Cortisol	1000 ng/mL	0,0 %
Cortisona	1000 ng/mL	0,0 %
Danazol	1000 ng/mL	0,0 %

Reaccionante cruzado	Concentración probada	Promedio en % de reactividad cruzada
Dexametasona	2000 ng/mL	0,0 %
DHEA	1000 ng/mL	0,0 %
DHEA-S	10000 ng/mL	0,0 %
5a-dihidrotestosterona (DHT)	500 ng/mL	0,0 %
Estradiol	1000 ng/mL	0,0 %
Estriol	100 ng/mL	0,0 %
Estrona	1000 ng/mL	0,0 %
Etisterona	100 ng/mL	0,0 %
Norgestrel	100 ng/mL	0,0 %
Prednisona	1000 ng/mL	0,0 %
Pregnenolona	5000 ng/mL	0,0 %
Progesterona	1000 ng/mL	0,0 %
Propionato de testosterona	1000 ng/mL	0,0 %

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en la Free Testosterone ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	7 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

14.7 Estudio en suero-plasma

El Free Testosterone ELISA estudio de comparación de la matriz se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 21 muestras (18 nativas, 3 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó un análisis de regresión lineal sobre los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	0,97 [0,92 a 1,02]	-0,02 [-1,01 a 0,98]	0,99
Heparina de litio	0,99 [0,97 a 1,02]	-0,01 [-0,40 a 1,02]	1,00
Heparina sódica	0,93 [0,87 a 0,99]	-0,01 [-1,12 a 1,10]	0,99
EDTA	1,03 [0,97 a 1,08]	0,27 [0,74 a 1,28]	0,99

15 LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁶. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

16 GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

17 INFORMACIÓN DE INCIDENTES GRAVES

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

18 BIBLIOGRAPHY

1. Shea JL, Wong PY, Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem*. 2014;63:59-84.
2. Diver MJ. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. *Ann Clin Biochem*. 2006 Jan;43(Pt 1):3-12.
3. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB and McKinlay JB. The Effect of Diurnal Variation on Clinical Measurement of Serum Testosterone and Other Sex Hormone Levels in Men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Mar; 94(3): 907–913.
4. Rajfer J. Decreased Testosterone in the Aging Male. *Rev Urol*. 2003;5(suppl 1):S1–S2.
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

19 SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité