

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Testosterone free ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
Free Testosterone in human serum and plasma



DE2924



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO / CONTENU

1.	INTENDED USE	3
2.	CLINICAL SIGNIFICANCE	3
3.	PRINCIPLE	3
4.	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION	4
5.	WARNINGS	4
6.	PRECAUTIONS	5
7.	PROCEDURE	6
8.	QUALITY CONTROL	7
9.	RESULTS	7
10.	REFERENCE VALUES	7
11.	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	8
12.	WASTE MANAGEMENT	8
13.	BIBLIOGRAPHY	9
14.	ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS	9
1.	DESTINAZIONE D'USO	10
2.	SIGNIFICATO CLINICO	10
3.	PRINCIPIO DEL METODO	10
4.	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	11
5.	AVVERTENZE	11
6.	PRECAUZIONI	12
7.	PROCEDIMENTO	13
8.	CONTROLLO QUALITA'	14
9.	RISULTATI	14
10.	VALORI DI RIFERIMENTO	14
11.	PARAMETRI CARATTERISTICI	15
12.	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO	15
13.	BIBLIOGRAFIA	16
14.	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING	16
1.	USO PREVISTO	17
2.	SIGNIFICADO CLÍNICO	17
3.	PRINCIPIO DEL MÉTODO	17
4.	REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	18
5.	ADVERTENCIAS	18
6.	PRECAUCIONES	19
7.	PROCEDIMIENTO	20
8.	CONTROL DE CALIDAD	21
9.	RESULTADOS	21
10.	VALORES DE REFERENCIA	21
11.	PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS	22
12.	DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN	22
13.	BIBLIOGRAFÍA	23
14.	SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING	23
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	24

1. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Free Testosterone concentration in human serum or plasma. Second generation kit. Free Testosterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone is a steroid hormone from the androgen group. Testosterone is primarily secreted in the testes of males and the ovaries of females although small amounts are secreted by the adrenal glands. It is the principal male sex hormone and an anabolic steroid. In both males and females, it plays key roles in health and well-being. Due to its insolubility in aqueous solutions, for the most part Testosterone circulates in the blood bound to transport proteins. Only a small percentage (< 1%) of circulating Testosterone exists as unbound or free Testosterone. The majority, approximately 60%, is bound to SHBG with high affinity, while the remainder is loosely bound to albumin. Both the albumin-bound and free fractions may be biologically active, while SHBG effectively inhibits Testosterone action. Testosterone effects can be classified as *virilizing* and *anabolic* effects. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs. Testosterone levels decline gradually with age in men. Measurement of the free or unbound fraction of serum Testosterone has been proposed as a means of estimating the physiologically bioactive hormone. Free Testosterone levels are elevated in women with hyperandrogenism associated with hirsutism in the presence or absence of polycystic ovarian disease. In addition, free Testosterone measurements may be more useful than total Testosterone in situations where SHBG is increased or decreased (e.g. hypothyroidism and obesity).

3. PRINCIPLE

Testosterone in the blood is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin). Only the measurement of Free Testosterone (< 1% of Total Testosterone) permits the estimating of the hormone biologically active. Free Testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) present in the Conjugate for binding to the antibodies anti-Testosterone coated on the microplate (solid phase). The Testosterone bound to proteins does not take part to this reaction, so it is washed away during the washing step (for total Testosterone measurement the ELISA "Testosterone" kit is available). After 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 color that changes into yellow when the Stop Solution is added. The color intensity is inversely proportional to the Free Testosterone concentration in the sample. Free Testosterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. **CAL 0 - 5** Calibrators (6 vial, 1 mL each)
2. **CONTROL 1 & 2** Controls (2 vials, 1 mL each), Control 1 and 2. Controls concentration is indicated on the Certificate of Analysis
3. **ENZ CONJ** Conjugate (1 vial, 15 mL). Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
4. **SORB MT** Coated Microplate (1 breakable microplate). Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate
5. **SUB TMB** TMB Substrate (1 vial, 15 mL). H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (*avoid any skin contact*)
6. **STOP SOLN** Stop Solution (1 vial, 15 mL). Acidic solution 0.3 N (*avoid any skin contact*)
7. **WASH SOLN 10x** 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL) 0.2M Phosphate buffer pH 7.4

4.2. Reagents necessary not supplied

- Distilled water.

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

- Automatic dispenser.
- Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note: Store all reagents at 2±8°C in the dark. Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

5. 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 reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be 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 acidic solution. Acidic solution is poisonous and 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.
- This method allows the determination of Free Testosterone from 0.2 pg/mL to 100.0 pg/mL.
- The clinical significance of Free Testosterone determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

6. 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 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials 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.

7. PROCEDURE

7.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer. The Calibrators are ready for use and have the following concentration of Testosterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	0.2	1.0	4.0	20.0	100.0

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C. Unit conversion: pmol/L = 3.47*pg/mL

7.2. Preparation of the Sample

The determination of free Testosterone can be performed in human serum or plasma. Store specimen at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. The Controls are ready to use.

7.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals; for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL on taking care also transfer the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

7.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°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 (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
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	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°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.			

8. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Free Testosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

9. RESULTS

9.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C_0 - C_5) and of each sample.

9.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C_0 - C_5) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

9.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

10. REFERENCE VALUES

Serum concentrations of free Testosterone are within the following ranges:

	n° sera	Median pg/mL	Range pg/mL
Male (age)			
< 12	23	0,26	ND - 4,60
12 - 18	23	6,65	0,18 - 23,08
19 - 55	67	11,56	1,00 - 28,28
> 55	35	6,46	0,70 - 21,45
Female (age)			
< 12	20	ND	ND - 1,46
12 - 18	29	0,91	ND - 2,24
19 - 55	57	0,61	ND - 2,85
> 55	31	0,49	ND -1,56

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

11.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different serum samples in the same assay. The within assay variability is $\leq 8,9\%$.

11.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera in 10 different assays. The between assay variability is $\leq 12,4\%$.

11.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of free Testosterone that can be distinguished from Calibrator 0 is 0.04 pg/mL.

11.3. Specificity

The specificity was assessed by measuring the apparent response of the assay to the following potentially cross-reactive analytes and interfering substances (Anticoagulants).

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

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

11.4. Correlation

Free Testosterone ELISA was compared to the Siemens Free Testosterone RIA kit, commercially available. 51 serum samples were analysed. The linear regression curve was calculated:

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

$$r^2 = 0,94$$

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

13. BIBLIOGRAPHY

1. McCann D, Kirkish L. J. Clin. Immunoassay 8:234-6 (1985)
2. EkinsRP., J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163 – 80
3. Paulson JD, et al., Am. J Obst. Gynecol 1977;128:851-7
4. Odland V. et al., Clin. Endocrinology 1982;16:243-49
5. Green PJ., Clin Chem 1982;28:1237
6. Wu CH., Obstet Gynecol. 1982;60:188-94

14. ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

1. DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Testosterone libero nel siero o plasma umano. Kit di seconda generazione.

Il kit Free Testosterone ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

2. SIGNIFICATO CLINICO

Il Testosterone è un ormone steroideo del gruppo degli androgeni. Il Testosterone è secreto dai testicoli nei maschi e dalle ovaie nelle femmine anche se piccole quantità sono secrete dalle ghiandole adrenali. È il principale ormone sessuale maschile e uno steroide anabolico. Svolge ruoli chiave nella salute e nel benessere di uomini e donne.

Il Testosterone circola nel sangue per la maggior parte legato a proteine di trasporto a causa della sua insolubilità in soluzioni acquose. Soltanto una piccola parte (< 1%) del Testosterone circolante esiste come Testosterone non legato o libero. Circa il 60%, è legato alle SHBG con alta affinità, mentre il resto è legato all'albumina. Entrambe le frazioni albumina-legato e libero possono essere biologicamente attive, mentre il legame alle SHBG inibisce l'azione del Testosterone. Gli effetti del Testosterone possono essere classificati come effetti virilizzanti ed anabolici. Gli effetti anabolici includono lo sviluppo della massa muscolare e la resistenza, aumento della densità e della resistenza ossea e stimolazione dello sviluppo lineare dell'osso. Gli effetti di virilizzanti includono la maturazione degli organi sessuali.

I livelli del Testosterone declinano gradualmente con l'età negli uomini.

Un metodo per valutare l'ormone fisiologicamente bioattivo è la misura della frazione libera o non legata del Testosterone nel siero. I livelli di Testosterone libero sono elevati in donne con l'iperandrogenismo connesso con l'irsutismo in presenza o assenza di ovaie policistiche. In più, la misurazione del Testosterone libero è più utile della misurazione di Testosterone totale in situazioni in cui l'SHBG è aumentato o diminuito (per esempio ipotiroidismo e obesità).

3. PRINCIPIO DEL METODO

Nel sangue il Testosterone è legato alle SHBG (60%) ed in minore quantità ad altre proteine (ad esempio albumina). Solo la misura del Testosterone libero (<1% del Testosterone totale) permette la stima dell'ormone biologicamente attivo.

Il Testosterone libero (antigene) presente nel campione compete con il Testosterone antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) presente nel Coniugato nei confronti dell'anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra (fase solida). Il Testosterone legato a proteine non partecipa a questa competizione e viene lavato via durante la fase di lavaggio (per la misura del Testosterone totale è disponibile il kit ELISA "Testosterone").

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution.

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del Testosterone libero presente nel campione. La concentrazione di Testosterone libero nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. **CAL 0 - 5** Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno).
2. **CONTROL 1 & 2** Controls (2 flaconi , 1 mL ciascuno). Control 1 + 2. La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi
3. **ENZ CONJ** Conjugate (1 flacone, 15 mL). Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)
4. **SORB MT** Coated Microplate (1 micropiastra breakable). Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra
5. **SUB TMB** TMB Substrate (1 flacone, 15 mL). H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
6. **STOP SOLN** Stop Solution (1 flacone, 15 mL). Acido Soluzione 0,3 N (*evitare il contatto con la pelle*)
7. **WASH SOLN 10x** 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL). Tampone fosfato 0.2M pH 7,4

4.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

- Acqua distillata.

4.3 Materiale e strumentazione ausiliare

- Dispensatori automatici.
- Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

5. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non usare internamente nè esternamente su esseri umani o animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido soluzione diluito. L'acido soluzione è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Testosterone libero da 0,2 pg/mL a 100,0 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Testosterone.

6. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso.
- Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

7. PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per 5 minuti. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Testosterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

Stabili 6 mesi a 2-8°C dall'apertura dei flaconcini. Unità di conversione: pmol/L = 3.47*pg/mL

7.2 Preparazione del campione

La determinazione del Testosterone libero si effettua su siero o plasma umano. Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. I Controlli sono pronti all'uso.

7.3 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione, diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

7.4 Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	20 µL		
Campione/Controllo		20 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C.			
Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 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	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°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.			

8. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Testosterone libero per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

9. RISULTATI

9.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_5) e di ogni campione.

9.2 Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun Calibratore (C_0 - C_5) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

9.3 Calcolo dei risultati

Interpolare i risultati sul grafico, leggendo i valori di concentrazione in pg/mL corrispondenti alle assorbanze di ciascun campione sulla curva disegnata.

10. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche di Testosterone libero sono comprese nei seguenti intervalli:

	n° sieri	Mediana pg/mL	Range pg/mL
Maschi (anni)			
< 12	23	0,26	ND - 4,60
12 - 18	23	6,65	0,18 - 23,08
19 - 55	67	11,56	1,00 - 28,28
> 55	35	6,46	0,70 - 21,45
Femmine (anni)			
< 12	20	ND	ND - 1,46
12 - 18	29	0,91	ND - 2,24
19 - 55	57	0,61	ND - 2,85
> 55	31	0,49	ND - 1,56

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI**11.1 Precisione****11.1.1 Intra-Assay**

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è ≤ 8,9%.

11.1.2 Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la concentrazione di tre differenti campioni sierici. La variabilità inter-assay è ≤ 12,4%.

11.2 Sensibilità

La minore concentrazione di Testosterone libero che può essere distinta dal Calibratore zero è 0,04 pg/mL con limite di confidenza del 95%.

11.3 Specificità

Sono stati dosati i potenziali antigeni cross reagenti e alcune sostanze interferenti (anticoagulanti) L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Analita	% Cross-reattività
DHT	0,08220%
ANDROSTENEDIONE	0,13200%
ANDROSTERONE	0,00005%
DHEA-S	< 0,00001%
CORTISONE	< 0,00001%
CORTISOLO	< 0,00001%
17β-ESTRADIOLO	0,00069%
ESTRONE	< 0,00001%
PREGNENOLONE	< 0,00001%
17α-ETHINIL-ESTRADIOLO	0,00002%
NORGESTREL	0,00590%
DANAZOLO	0,00327%
ALDOSTERONE	< 0,00001%
ESTRIOLO	0,00009%
EPITESTOSTERONE	0,00001%
PROGESTERONE	< 0,00001%
17αOH-PROGESTERONE	0,00008%
DHEA	0,00003%
PREDNISONONE	< 0,00001%
SODIO CITRATO	< 0,00001%
EDTA	< 0,00001%
EPARINA	< 0,00001%

11.4 Correlazione con RIA

Il kit Free Testosterone ELISA è stato comparato con il kit Free Testosterone RIA Siemens disponibile in commercio. Sono stati testati 51 campioni sierici. La curva di regressione è:

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

$$r^2 = 0,94$$

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

13. BIBLIOGRAFIA

1. McCann D, Kirkish L. J. Clin. Immunoassay 1985;8:234-6
2. EkinsRP. , J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163 – 80
3. Paulson JD, et al., Am. J Obst. Gynecol 1977;128:851-7
4. Odland V. et al., Clin. Endocrinology 1982;16:243-49
5. Green PJ., Clin Chem 1982;28:1237
6. Wu CH., Obstet Gynecol. 1982;60:188-94

14. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)
- CV% intrasaggio elevato
- reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
- CV% intersaggio elevato
- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

1. USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de testosterona libre en suero o plasma humano. Kit de segunda generación. El kit Free Testosterone está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

2. SIGNIFICADO CLÍNICO

La testosterona es una hormona esteroidea del grupo de los andrógenos. La testosterona es secretada por los testículos en los hombres y por los ovarios en las mujeres, aunque pequeñas cantidades son secretadas por las glándulas suprarrenales. Es la principal hormona sexual masculina y un esteroide anabólico. Desempeña funciones clave para la salud y el bienestar de hombres y mujeres. La testosterona circula en la sangre en su mayor parte consolidados para el transporte de proteínas a causa de su insolubilidad en soluciones acuosas. Solo una pequeña parte (< 1%) de la testosterona circulante existe como testosterona no unida o libre. Alrededor del 60% está unida a SHBG con alta afinidad, mientras que el resto se une a la albúmina. Ambas fracciones, unida a la albúmina y libre, pueden ser biológicamente activas, mientras que el enlace a SHBG inhibe la acción de la testosterona. Los efectos de la testosterona pueden clasificarse como virilizantes y anabólicos. Entre los efectos anabólicos se incluyen el desarrollo de la masa muscular y la resistencia, el aumento de la densidad y de la resistencia ósea, y la estimulación del desarrollo lineal del hueso. Entre los efectos virilizantes se incluye la maduración de los órganos sexuales. Los niveles de testosterona disminuyen gradualmente con la edad en los hombres. La medición de la fracción libre o no unida de testosterona en suero es un método para evaluar la hormona fisiológicamente bioactiva. Los niveles de testosterona libre son elevados en mujeres con hiperandrogenismo asociado con hirsutismo en presencia o ausencia de ovarios poliquísticos. Además, la medición de la testosterona libre resulta más útil que la medición de la testosterona total en situaciones en las que la SHBG aumenta o disminuye (por ejemplo, hipotiroidismo y obesidad).

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La testosterona en la sangre se une a las SHBG (60%) y, en menor cantidad, a otras proteínas (por ejemplo albúmina). Solo la medición de la testosterona libre (<1% del total) permite la estimación de la hormona biológicamente activa. La testosterona "libre" (antígeno) presente en la muestra compete con la testosterona marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-testosterona absorbido en la microplaca (fase sólida). La testosterona unida a las proteínas no participa en esta reacción y es eliminada durante la fase de lavado (para la medición de la testosterona total está disponible el kit ELISA Demeditec "Testosterone"). Después de la incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último la enzima HRP presente en el conjugado que se unió a la fase sólida cataliza la reacción entre el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4). La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno marcado y, por lo tanto, inversamente proporcional a la concentración de testosterona "libre" presente en la muestra.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. **CAL 0 – 5** Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)
2. **CONTROL 1 & 2** Control (2 frascos, 1 mL cada uno) Control 1 & Control 2; La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)
3. **ENZ CONJ** Conjugado (1 frasco, 15 mL) Testosterona conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)
4. **SORB MT** Microplaca recubierta (1 microplaca rompible) Anticuerpo anti testosterona absorbido en la microplaca
5. **SUB TMB** Substrato TMB (1 frasco, 15 mL) H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)
6. **STOP SOLN** Solución de parada (1 frasco, 15 mL) Ácido sulfúrico 0,15M (*evitar el contacto con la piel*)
7. **WASH SOLN 10x** Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL) 0.2M Tampón fosfato, pH 7,4

4.2 Reactivos necesarios no suministrados en el kit

- Agua destilada.

4.3 Material e instrumentación auxiliares

- Dispensadores automáticos.
- Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8 °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

5. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de testosterona de 0,2 pg/mL a 100,0 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de testosterona.

6. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Antes del uso, dejar durante 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones de testosterona:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	0,2	1,0	4,0	20,0	100,0

Estables 6 meses a 2÷8°C desde la apertura de los frascos.

Conversión de unidades: pmol/L = 3,47*pg/mL

7.2 Preparación de la muestra

La determinación de la testosterona se realiza en suero o plasma humano. Si la prueba no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras. El Control está listo para usar.

7.3 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 10X con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

7.4 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	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 3 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.			
Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	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.			

8. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de testosterona libre para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

9. RESULTADOS

9.1 Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 – C_5) y de cada muestra.

9.2 Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 – C_5) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

9.3 Cálculo de los resultados

Interpolarse los resultados del gráfico leyendo los valores de concentración en pg/mL correspondientes a las absorbancias de cada muestra en la curva diseñada.

10. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones séricas de Testosterona “libre” se incluyen en los siguientes intervalos:

	n° sueros	Media pg/mL	Rango pg/mL
Hombres (edad)			
< 12	23	0,26	ND - 4,60
12 - 18	23	6,65	0,18 - 23,08
19 - 55	67	11,56	1,00 - 28,28
> 55	35	6,46	0,70 - 21,45
Mujeres (edad)			
< 12	20	ND	ND - 1,46
12 - 18	29	0,91	ND - 2,24
19 - 55	57	0,61	ND - 2,85
> 55	31	0,49	ND -1,56

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

11.1 Precisión

11.1.1 Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres muestras séricas distintas. La variabilidad intraensayo es $\leq 8,9\%$

11.1.2 Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la concentración de cinco sueros de control distintos y dos muestras séricas. La variabilidad interensayo es $\leq 12,4\%$.

11.2 Sensibilidad

La concentración mínima de testosterona libre medible que se pueden distinguir del Calibrador 0 es 0,04 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

11.3 Especificidad

Se han analizado los potenciales antígenos de reactividad cruzada y algunas sustancias interferentes (anticoagulantes). El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Analito	% Reactividad cruzada
DHT	0.08220%
ANDROSTENEDIONA	0.13200%
ANDROSTERONA	0.00005%
DHEA-S	< 0,00001%
CORTISONA	< 0,00001%
CORTISOLO	< 0,00001%
17 β -ESTRADIOLO	0.00069%
ESTRONA	< 0,00001%
PREGNENOLONA	< 0,00001%
17 α -ETHINIL-ESTRADIOLO	0.00002%
NORGESTREL	0.00590%
DANAZOLO	0.00327%
ALDOSTERONA	< 0,00001%
ESTRIOLO	0.00009%
EPITESTOSTERONA	0.00001%
PROGESTERONA	< 0,00001%
17 α OH-PROGESTERONA	0.00008%
DHEA	0.00003%
PREDNISONA	< 0,00001%
SODIO CITRATO	< 0,00001%
EDTA	< 0,00001%
EPARINA	< 0,00001%

11.4 Correlación con RIA

El kit Demeditec Free Testosterone ELISA se ha comparado con el kit Free Testosterone RIA Siemens disponible en el mercado. Se han comprobado 51 muestras. La curva de regresión es:

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

$$r^2 = 0,94$$

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. McCann D, Kirkish L. J. Clin. Immunoassay 1985;8:234-6
2. EkinsRP. , J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163 – 80
3. Paulson JD, et al., Am. J Obst. Gynecol 1977;128:851-7
4. Odland V. et al., Clin. Endocrinology 1982;16:243-49
5. Green PJ., Clin Chem 1982;28:1237
6. Wu CH., Obstet Gynecol. 1982;60:188-94

14. SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja












Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)
- CV% intraensayo elevado
- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)
- CV% interensayo elevado
- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts- kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore