



Free Testosterone



Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso/ Instrucciones de uso

| | |
|---|----|
| English | 2 |
| Français | 9 |
| Italiano | 17 |
| Español | 25 |
| Bibliography/Bibliographie/Bibliografia/Bibliografía | 34 |
| Packaging materials / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje | 34 |
| Symbols Key / Explication des symboles / Legenda / Símbolos | 35 |
| Summary of Test Procedure / Résumé de la procédure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica | 36 |

| |
|-----|
| REF |
|-----|

DNOV009 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

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. INTENDED USE

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).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Free Testosterone ELISA is a competitive enzyme immunometric assay (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 Microtiterplate (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 (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) 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.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Testosterone, in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.15 M (avoid any skin contact).
- **Conjugate:** 1 bottle containing 15 mL of horseradish peroxidase labelled Testosterone.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26 g/L), (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10x conc.:** 1 bottle containing 50 mL of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4.
- **Control A:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific, ready to use control solution. The concentration is stated on the label.
- **Control B:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific, ready to use control solution. The concentration is stated on the label.

- **Standards:** 6 bottles, 1 mL each
 - Standard 0: 0.0 pg/mL
 - Standard 1: 0.2 pg/mL
 - Standard 2: 1.0 pg/mL
 - Standard 3: 4.0 pg/mL
 - Standard 4: 20.0 pg/mL
 - Standard 5: 100.0 pg/mL

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate
- Pipettes
- Roller shaker
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark. Once opened, the kit is stable at 2...8 °C for 6 months.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28 °C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay store the reagents immediately at 2...8 °C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Testosterone antibodies. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Conjugate

Testosterone-HRP Conjugate is a ready to use solution.

6.3. Standards

Before use mix 5 min. with a rotating mixer. The standards are ready to use. After first use the standards are still stable for another 6 months if stored at 2...8 °C.

6.4. Controls

Before use mix 5 min. with a rotating mixer. The bottles contain 1 mL of a lot-specific control solution, ready to use. The concentration is indicated on the label.

6.5. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 mL of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.6. Stop Solution

The bottle contains 15 mL 0.15 M sulphuric acid solution. This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C.

6.7. Wash Solution

Dilute the content of the concentrated 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 it 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 to transfer crystals with washing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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...8 °C | 24 hours |
| Freeze/thaw cycles | 1 cycle |

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If it lasts more than ten minutes, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

| | | |
|---------|--------------|-------------------------|
| 1 well | (e.g. A1) | for the substrate blank |
| 2 wells | (e.g. B1+C1) | for standard 0 |
| 2 wells | (e.g. D1+E1) | for standard 1 |
| 2 wells | (e.g. F1+G1) | for standard 2 |
| 2 wells | (e.g. H1+A2) | for standard 3 |
| 2 wells | (e.g. B2+C2) | for standard 4 |
| 2 wells | (e.g. D2+E2) | for standard 5 |
| 2 wells | (e.g. F2+G2) | for control A |
| 2 wells | (e.g. H2+A3) | for control B |

It is recommended to determine standards, controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

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

Adjust the incubator to 37 °C.

1. Dispense 20 µL standards, controls and samples into their respective wells. Add 100 µL conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour at 37 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. 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: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28 °C) in the dark.**
7. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the Microtiterplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
8. Measure the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate Reader to **zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** against a reference wavelength of 620-630 nm or against the blank within 5 min. Record the absorbance values for each standard and patient sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. 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. Standard 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:

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

10. 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.

We recommend 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 Certificate of Analysis (CoA) 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.

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. REFERENCE 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. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

14.1. Analytical Sensitivity

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 14.5.

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 (unit) | Mean %Cross reactivity |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 11-keto-testosterone | 100 ng/mL | 0.1% |
| 11-β-hydroxy-testosterone | 10 ng/mL | 0.2% |
| 17αOH-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 | 10 000 ng/mL | 0.0% |
| 5α-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 THE PROCEDURE

- 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. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300[®] 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 sulphuric acid solution. Sulphuric acid 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.
- The clinical significance of Free Testosterone determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.
- 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.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).

16.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

17. ORDERING INFORMATION

REF

DNOV009

Free Testosterone

(96 Determinations)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

La testostérone se trouve dans la circulation principalement liée à des protéines porteuses, la plus courante étant la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG). La testostérone joue un rôle déterminant dans le développement des caractères sexuels primaires et secondaires chez l'homme et participe à la production des hormones sexuelles féminines.

Seuls 1 à 2 % de la testostérone en circulation ne sont pas liés à une protéine et sont biologiquement actifs - on parle alors de "testostérone libre" (TS). La testostérone biodisponible correspond à la somme de la TS et de la testostérone liée à l'albumine sérique, car elle est liée avec une faible affinité et peut facilement se dissocier pour être disponible pour sa fonction biologique.

Chez les hommes, des taux élevés de testostérone sont associés à plusieurs conditions telles que la puberté précoce, l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), le syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA), l'utilisation de stéroïdes et les tumeurs testiculaires ou surrénales. Les principales causes d'une baisse des taux sont le syndrome de Klinefelter, les lésions testiculaires, les troubles hypophysaires, etc. Chez les femmes de tous âges, des taux élevés de testostérone peuvent être associés à diverses pathologies virilisantes, notamment les tumeurs surrénales et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

Ces conditions cliniques sont associées à un manque ou à un excès de testostérone dans la circulation (hypoandrogénie ou hyperandrogénie). Le diagnostic de ces troubles implique la quantification de la testostérone totale (TT) en association avec d'autres preuves cliniques et données de laboratoire. Cependant, les manifestations cliniques des troubles androgéniques sont souvent associées à des niveaux normaux de TT. Dans de tels cas, des informations supplémentaires peuvent être obtenues par l'évaluation du taux de FT, biologiquement actif. Plusieurs troubles androgéniques peuvent être causés par une altération de la production de SHBG qui affecte les niveaux de FT disponibles dans le sérum.

La mesure du FT peut être considérée comme utile dans le diagnostic de plusieurs conditions, y compris la déficience androgénique chez les hommes et l'excès androgénique chez les femmes¹. L'évaluation des niveaux de testostérone libre peut s'avérer bénéfique² et éviter un diagnostic incorrect d'hypogonadisme dans les cas où de faibles concentrations de testostérone totale sont déterminées et où des altérations de la SHBG sont suspectées.

Il existe une variation circulaire observée et bien documentée des niveaux de testostérone chez les hommes, les concentrations circulantes étant plus élevées le matin et diminuant au cours de la journée³. Les niveaux de testostérone diminuent également chez les hommes vieillissants (andropause) et sont associés à une perte de masse musculaire et osseuse, entraînant une ostéoporose, une perte de libido, un dysfonctionnement érectile. Dépression et altération des fonctions cognitives⁴.

2. INDICATION D'UTILISATION

Free Testosterone ELISA est un test manuel de diagnostic *in vitro* destiné à la détermination quantitative de la testostérone libre dans le sérum ou le plasma humain. Les résultats doivent être utilisés conjointement avec d'autres paramètres cliniques et de laboratoire pour faciliter le diagnostic et le suivi des troubles impliquant les hormones sexuelles mâles (androgènes).

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le Free Testosterone ELISA est un test immunoenzymatique compétitif (ELISA) dans lequel la testostérone libre (antigène) de l'échantillon entre en compétition avec la testostérone antigénique conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) pour se lier au nombre limité d'anticorps anti-testostérone déposés sur la Plaque de Microtitrage (phase solide).

Après l'incubation, la séparation liée/libre est effectuée par un simple lavage de la phase solide. Ensuite, l'enzyme HRP dans la fraction liée réagit avec le Substrat (H₂O₂) et le Substrat TMB et développe une couleur bleue qui vire au jaune lorsque la Solution d'Arrêt (H₂SO₄) est ajoutée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone libre dans l'échantillon.

La concentration de testostérone libre dans l'échantillon est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 bandes détachables enduites anti-testostérone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop :** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0.15 M (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 15 mL de Testostérone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/L) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10) :** 1 flacon contenant 50 mL d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois à 0,2 M, pH 7.4.
- **Contrôle A :** 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

- **Contrôle B** : 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Étalons** : 6 flacons, 1 mL chacun

| | |
|-----------|-------------|
| Étalon 0: | 0,0 pg/mL |
| Étalon 1: | 0,2 pg/mL |
| Étalon 2: | 1,0 pg/mL |
| Étalon 3: | 4,0 pg/mL |
| Étalon 4: | 20,0 pg/mL |
| Étalon 5: | 100,0 pg/mL |

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

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

5. STABILITÉ ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés à 2...8 °C dans l'obscurité. Une fois ouvert, le kit est stable à 2...8 °C pendant 6 mois.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important de porter tous les réactifs, échantillons et étalon à température ambiante (22...28 °C) pendant au moins 30 minutes avant de commencer le test ! A la fin du test, conservez les réactifs immédiatement à 2...8 °C ; évitez une exposition prolongée à la température ambiante.

6.1. Plaque de Microtitrage

Les bandes détachables prêtes à l'emploi sont recouvertes d'anticorps anti-Testostérone. Conserver à 2...8 °C. N'ouvrez le sachet que lorsqu'il est à température ambiante. Immédiatement après le retrait des bandes, les bandes restantes doivent être refermées dans la feuille d'aluminium avec le dessiccateur fourni et conservées à 2...8 °C ; stabilité jusqu'à la date de péremption. Après la première utilisation, les étalons sont encore stables pendant 6 mois s'ils sont stockés à 2...8 °C.

6.2. Conjugué

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

6.3. Étalons

Avant utilisation, mélanger 5 min. avec un agitateur à rouleaux. Les étalons sont prêts à l'emploi. *Après la première utilisation, les standards sont encore stables pendant 6 mois s'ils sont stockés à 2...8 °C.*

6.4. Contrôles

Avant utilisation, mélanger 5 min. avec un agitateur à rouleaux. Les flacons contiennent 1 mL d'une solution de contrôle spécifique au lot, prête à l'emploi La concentration est indiquée sur l'étiquette.

6.5. Solution TMB

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

6.6. Solution stop

Le flacon contient 15 mL d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M. Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à 2...8 °C.

6.7. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentré avec de l'eau distillé jusqu'à un volume final de 500 mL avant utilisation. Pour des volumes inférieurs, respecter le ratio de dilution de 1:10. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours à 2...8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 mL en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le test doit être réalisé à partir d'échantillons de sérum (tubes de prélèvement standard ou tubes contenant un gel séparateur de sérum) ou de plasma (héparine de lithium, héparine de sodium ou EDTA de potassium).

| Stockage des échantillons | Durée |
|-------------------------------------|--------------|
| 2...8 °C | 24 heures |
| Cycles de congélation/décongélation | 1 cycle |

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

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

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

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

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

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

Régler l'incubateur à 37 °C.

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

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

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

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

8.2. Mesure

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

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

Mesurez l'absorbance de tous les puits à **450 nm** par rapport à une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou par rapport au blanc dans les 5 minutes. Enregistrez les valeurs d'absorbance de chaque étalon et échantillon de patient.

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

9. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe divers logiciels de réduction des données, qui peuvent être utilisés pour générer la courbe d'étalonnage moyenne et calculer les concentrations moyennes des échantillons inconnus et des contrôles. Un ajustement de courbe logarithmique à **4 paramètres (4PL), incluant l'étalon 0**, est nécessaire.

On peut également préparer une courbe d'étalonnage sur du papier graphique semi-logarithmique en traçant un graphique avec l'absorbance moyenne sur l'axe des ordonnées en fonction de la concentration de l'analyte sur l'axe des abscisses. L'étalon 0 doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Lire la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon inconnu sur la courbe.

Conversion des unités

Pour convertir les résultats en unités SI :

$$\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3,47$$

Pour convertir les résultats en unités de masse :

$$\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$$

10. CONTROLE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent l'utilisation d'échantillons de contrôle de qualité dans chaque série de tests afin de vérifier la performance du test. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus, et les résultats analysés à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Les contrôles fournis dans le kit doivent être testés comme des inconnus et sont destinés à aider à évaluer la validité des résultats obtenus avec chaque plaque de test.

Nous recommandons aux utilisateurs de conserver des enregistrements graphiques des valeurs de contrôle générées par chaque essai, y compris les moyennes courantes, les écarts types et le %CV. Cette information facilitera l'analyse des tendances des contrôles concernant la performance des lots de contrôle actuels et historiques par rapport aux données de contrôle de la qualité fournies. L'analyse des tendances permettra d'identifier les essais qui donnent des valeurs de contrôle significativement différentes de leur plage moyenne.

Lors de l'interprétation des données de contrôle, les utilisateurs doivent noter que ce produit a été conçu et développé comme un produit manuel. La plage indiquée sur le *Certificate of Analysis (CoA)* doit être appropriée pour les analyses effectuées manuellement et en respectant strictement la procédure d'analyse décrite ci-dessus. Les professionnels du contrôle qualité reconnaissent qu'en raison des différences de conditions et de pratiques, il y aura toujours une variabilité des valeurs moyennes et de la précision des mesures de contrôle entre les différents laboratoires⁵.

11. INTERVALLE DE MESURE

L'intervalle de mesure du test (AMR) est de 0,34 à 70,0 pg/mL (1,18 à 242,9 pmol/L).

Toute valeur inférieure à 0,34 pg/mL (1,18 pmol/L) doit être signalée comme "< 0,34 pg/mL (< 1,18 pmol/L)". Toute valeur supérieure à 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L) doit être signalée comme "> 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L)".

12. MÉTROLOGIE ET TRAÇABILITÉ

Le test Free Testosterone ELISA a été normalisé par rapport à des standards de référence internes (matrice sérum) dont la valeur a été attribuée à une autre méthode de test disponible dans le commerce.

13. VALUES REFERENCE

Les plages suivantes ont été déterminées à l'aide du test Free Testosterone ELISA et sont fournies à titre d'information uniquement.

| | No. de participants | Médiane (pg/mL) | Intervalle de référence (pg/mL) |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------------------|
| Hommes | | | |
| 21 – 49 années | 120 | 14,13 | 5,01 – 27,78 |
| > 50 années | 120 | 12,75 | 4,11 – 21,85 |
| Femmes | | | |
| pré-menopausal | 120 | 0,55 | < LOQ – 1,70 |
| post-menopausal | 120 | 0,75 | < LOQ – 2,34 |

Les intervalles ci-dessus ne doivent être considérés que comme des lignes directrices; il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre fourchette attendue en fonction de sa propre population de patients.

14. PERFORMANCES DU TEST

Des données de performance représentatives sont présentées. Les résultats obtenus dans les laboratoires individuels peuvent varier.

14.1. Sensibilité Analytique

La limite du blanc (LoB), la limite de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées selon les directives de CLSI EP17-A, "Protocoles pour la détermination des limites de détection et des limites de quantification" en utilisant 6 blancs et 6 échantillons de faible niveau.

| Sensibilité | Concentration |
|--------------------------------|---------------|
| Limite du blanc (LoB) | 0,10 pg/mL |
| Limit de détection (LoD) | 0,20 pg/mL |
| Limite de quantification (LoQ) | 0,34 pg/mL |

14.2. Véracité

La véracité a été démontré par une comparaison de méthode entre le test Free Testosterone ELISA et un test disponible dans le commerce utilisant des échantillons de donneurs natifs - voir section 14.5.

14.3. Précision

La précision du test Free Testosterone ELISA a été déterminé en effectuant une étude de précision complexe.

Répétabilité : Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs.

Les données d'un lot représentatif sont présentées ci-dessous :

| Échantillon | n | Conc. moyenne (pg/mL) | Au cours d'une même série (Répétabilité) | |
|-------------|----|-----------------------|--|-------|
| | | | 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% |

Reproductibilité: Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs. Les résultats pour les données combinées de deux lots sont présentés ci-dessous:

| Échantillon | n | Conc. moyenne (pg/mL) | Au sein du laboratoire (Reproductibilité) | |
|-------------|-----|-----------------------|---|-------|
| | | | 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. Linéarité

La linéarité a été évalué selon la norme CLSI EP-06, " Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Pour la concentration de testostérone libre par Free Testosterone ELISA, la procédure de mesure montre une linéarité pour l'intervalle de 0,27 à 89,83 pg/mL dans la déviation admissible de linéarité (ADL) de $\pm 15\%$.

14.5. Comparaison de méthode

Le test Free Testosterone ELISA a été comparé à un test ELISA manuel quantitatif disponible dans le commerce, conformément à la norme CLSI EP-9A, " Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ". Un total de 95 échantillons, sélectionnés pour représenter une large gamme de concentrations de testostérone libre, a été analysé par chaque méthode. Une analyse de régression Passing-Bablok a été effectuée sur les données comparatives :

| n | Slope [95% CI] | Interception (pg/mL) [95% CI] | Coefficient de corrélation (r) |
|----|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 95 | 0,94 [0,88 to 0,99] | -0,02 [-0,14 to 0,06] | 0,93 |

14.6. Réaction-Croisée

La spécificité a été évalué avec les réactifs croisés suivants.

| Réactif croisé | Concentration testé (unit) | Moyen (%) réactivité croisée |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 11-keto-testosterone | 100 ng/mL | 0,1% |
| 11-β-hydroxy-testosterone | 10 ng/mL | 0,2% |
| 17αOH-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% |
| 5α-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% |

Les substances suivantes n'interfèrent pas avec un biais de $> \pm 15\%$ dans le test Free Testosterone ELISA when lorsque les concentrations sont inférieures au seuil indiqué présenté dans le tableau suivant.

| Réactif potentiellement interférent | Concentration seuil |
|-------------------------------------|---------------------|
| 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. Étude sérum-plasma

L'étude de comparaison matricielle Free Testosterone ELISA a été réalisée afin d'évaluer la différence entre les types de tubes (tubes séparateurs de sérum (SST), plasma à l'héparine de lithium, plasma à l'héparine de sodium et plasma à l'EDTA K2) par rapport aux échantillons de contrôle (sérum supérieur rouge, sans additif) conformément aux directives CLSI EP9-A3. Un total de 21 échantillons (18 natifs, 3 spiked) pour couvrir la gamme ont été évalués. Une analyse de régression linéaire a été effectuée sur les données comparatives :

| Type d'échantillon | Slope [95% CI] | Intercepter (pg/mL) [95% CI] | Coefficient de corrélation (r) |
|---------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| SST | 0,97 [0,92 to 1,02] | -0,02 [-1,01 to 0,98] | 0,99 |
| Héparine de lithium | 0,99 [0,97 to 1,02] | -0,01 [-0,40 to 1,02] | 1,00 |
| Héparine de sodium | 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. LIMITES DE PROCÉDURE

- Comme dans le cas de toute procédure de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en relation avec la présentation clinique du patient et les autres informations dont dispose le médecin.
- Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies dans une population pédiatrique.
- Les anticorps hétérophiles présents dans le sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines des réactifs, interférant ainsi avec les immunodosages *in vitro*⁶. Les patients exposés régulièrement à des animaux ou à des produits sériques animaux peuvent être sujets à cette interférence et des valeurs anormales peuvent être observées.

16. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic *in vitro*.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VHI et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Utiliser les Equipements de Protection Individuels (EPI) appropriés dans de l'utilisation des réactifs fournis.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300[®] comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.

- Le TMB est un réactif irritant qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Eviter toute ingestion, inhalation, contact avec la peau ou les yeux.
- La solution stop est une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est un poison, corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau et les yeux pour éviter une brûlure chimique.
- Eviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière du soleil, aux métaux et oxydants. Ne pas congeler la solution.
- La signification clinique de la détermination de la testostérone libre peut ne pas être établie si le patient suit un traitement à la cortisone ou au stéroïdes naturels ou synthétiques.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit constant pour la reproductibilité. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse dans chaque plaque.
- L'ajout de TMB initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être ajoutée dans la manipulation pour éliminer toutes erreurs pendant la réaction.
- Suivre le mode d'emploi pour effectuer le contrôle qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et les sérums.
- Une grande précision est nécessaire pour la reconstitution et le dépôt des réactifs.
- Les échantillons contaminés microbiologiquement, hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés dans le dosage.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- Le kit ELISA est uniquement destiné à être utilisé par un personnel qualifié familiarisé avec les BPL.

16.1. Elimination des déchets

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

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

17. INFORMATION POUR LES COMMANDES

| |
|-----|
| REF |
|-----|

DNOV009

Free Testosterone

(96 Déterminations)

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

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. Nei 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. USO PREVISTO

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).

3. PRINCIPIO DEL TEST

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 Piastra di Microtitolazione (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.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Piastra di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi anticorpo anti-testosterone; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Soluzione Bloccante:** 1 fialone contenente 15 mL di acido solforico, 0,15 M (evitare qualsiasi contatto con la pelle).
- **Coniugato:** 1 fialone contenente 15 mL di testosterone coniugato a perossidasi in rafano.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 fialone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (H_2O_2 -TMB 0,26 g/L), (evitare qualsiasi contatto con la pelle).
- **Tampone di Lavaggio (10x conc.):** 1 fialone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 10 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,4.
- **Controllo A:** 1 fialone da 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto; pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.

- **Controllo B:** 1 flacone da 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto; pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **Calibratori:** 6 flaconi, 1 mL ciascuno
 - Calibratore 0: 0,0 pg/mL
 - Calibratore 1: 0,2 pg/mL
 - Calibratore 2: 1,0 pg/mL
 - Calibratore 3: 4,0 pg/mL
 - Calibratore 4: 20,0 pg/mL
 - Calibratore 5: 100,0 pg/mL

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso (IFU)

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Lettore di Piastre di Microtitolazione ELISA, attrezzato per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm, 620-630 nm
- Incubatore 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Pipette
- Miscelatore a rotazione
- Acqua distillata
- Provette monouso
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se conservati a 2...8 °C al buio. Una volta aperto, il kit è stabile se conservati a 2...8 °C per 6 mesi.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante portare tutti i reagenti, i campioni e gli standard a temperatura ambiente (22...28 °C) per almeno 30 minuti prima di iniziare il test! Al termine del test, conservare immediatamente i reagenti a 2...8 °C; evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.

6.1. Piastra di Microtitolazione

Le strisce divisibili, pronte all'uso, sono rivestiti con l'anticirpo anti-testosterone. Conservare a 2...8 °C. Aprire la busta solo quando è a temperatura ambiente. *Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere risigillate nella busta di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice e conservate a 2...8 °C, stabilità fino alla data di scadenza.*

6.2. Coniugato

Il coniugato Free Testosterone-HRP è una soluzione pronta all'uso.

6.3. Calibratori

Prima dell'uso, mescolare 5 minuti con un miscelatore rotante. Gli calibratori sono pronti all'uso. Dopo il primo utilizzo, gli calibratori rimangono stabili per altri 6 mesi se conservati a 2...8 °C.

6.4. Controlli

Prima dell'uso, mescolare 5 minuti con un miscelatore rotante. I flaconi contengono 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto, pronta all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.

6.5. Soluzione substrato TMB

Il flacone contiene 15 mL di un sistema tetrametilbenzidina/perossido di idrogeno. La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C al riparo dalla luce. *La soluzione deve essere incolore o può avere una leggera sfumatura blu. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e deve essere gettato via.*

6.6. Soluzione bloccante

Il flacone contiene 15 mL di soluzione di acido solforico 0,15 M. Questa soluzione pronta all'uso deve essere conservata a 2...8 °C.

6.7. Soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto della Soluzione di lavaggio concentrata con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL. Per volumi inferiori, rispettare il rapporto di diluizione 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2...8 °C. Nella soluzione di lavaggio concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in questo 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, facendo attenzione a trasferire i cristalli con il lavaggio del flacone, mescolare fino alla completa dissoluzione dei cristalli.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il test 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...8 °C | 24 ore |
| Cicli di congelamento/ scongelamento | 1 ciclo |

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del Test

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta osservanza delle istruzioni per l'uso di prova come descritto. Prima di iniziare il test, il piano di distribuzione e identificazione di tutti i campioni e gli standard deve essere accuratamente stabilito. Selezionare il numero richiesto di strisce o pozzetti per microtitolazione e inserirli nel supporto. Il pipettaggio dei campioni non deve durare più di dieci minuti, per evitare la deriva del test. Se dura più di dieci minuti, segua lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di risposta alla dose. Assegnare almeno:

- 1 pozzetto (ad esempio A1) per il bianco del substrato
- 2 pozzetti (ad esempio B1+C1) per lo standard 0
- 2 pozzetti (ad esempio D1+E1) per lo standard 1
- 2 pozzetti (ad esempio F1+G1) per lo standard 2
- 2 pozzetti (ad esempio H1+A2) per lo standard 3
- 2 pozzetti (ad esempio B2+C2) per lo standard 4
- 2 pozzetti (ad esempio D2+E2) per lo standard 5
- 2 pozzetti (ad esempio F2+G2) per il controllo A
- 2 pozzetti (ad esempio H2+A3) per il controllo B

Si raccomanda di determinare gli standard, i controlli e i campioni dei pazienti in duplicato.

Eseguire tutte le fasi del test nell'ordine indicato e senza ritardi apprezzabili tra le fasi.

Per la dispensazione di ogni standard e di ogni campione paziente, si deve utilizzare un puntale pulito e monouso.

Regolare l'incubatore a 37 °C.

1. Pipettare 20 µL di standard, controlli e campioni nei rispettivi pozzetti. Aggiungere 100 µL di coniugato in ogni pozzetto. Lasciare il pozzetto A1 per il Bianco del substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare per 1 ora a 37 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, rimuovere la pellicola, aspirare il contenuto dei pozzetti e lavare ogni pozzetto tre volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Evitare di traboccare dai pozzetti di reazione. Durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso battendo la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Lavaggio automatico: Nel caso in cui si utilizzi un'apparecchiatura automatica, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Nota: il lavaggio è fondamentale! Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e valori di assorbanza falsamente elevati.

5. Dispensare 100 µL di soluzione di substrato TMB in tutti i pozzetti.
6. **Incubare per 15 minuti esatti a temperatura ambiente (22...28 °C) al buio.**
7. Pipettare 100 µL di Soluzione Stpo in tutti i pozzetti nello stesso ordine e alla stessa velocità della Soluzione di substrato TMB. Agitare delicatamente la Piastra di Microtitolazione.
Qualsiasi colore blu sviluppato durante l'incubazione si trasforma in giallo.
8. Misurare l'assorbanza (E) a 450 nm rispetto a una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o rispetto al bianco entro 5 minuti.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro di Piastra di Microtitolazione ELISA a zero usando il **substrato-Bianco (Blank) nel pozzetto A1**.

Se - per motivi tecnici -, non è possibile regolare il di micropiastre ELISA a zero utilizzando il Bianco-substrato nel pozzetto A1, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza (E) del campione a **450 nm** rispetto a una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o rispetto al bianco entro 5 minuti. Registrare i valori di assorbanza per ogni calibrator e campione.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. 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 calibratore 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 sconosciuto dalla curva.

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:

$$\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$$

10. 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 test. 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.

Raccomandiamo 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 *Certificate of Analysis (CoA)* 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.

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 pmol/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 DI RIFERIMENTO

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

| | No. 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-menopausal | 120 | 0,55 | < LOQ – 1,70 |
| post-menopausal | 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 DEL TEST

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

14.1. Sensibilità analitica

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 14.5.

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%I] | Intercetta (pg/mL) [IC 95%] | Coefficiente di correlazione (r) |
|----|------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 95 | 0,94 [0,88 to 0,99] | -0,02 [-0,14 to 0,06] | 0,93 |

14.6. Cross-reattività

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

| Reagente-crociato | Concentrazione testata (unità) | Mean %Cross reactivity |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 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 | 3000 ng/mL | 0.0% |
| Androstenedione | 100 ng/mL | 0.0% |
| Cortisolo | 1000 ng/mL | 0.0% |
| Cortisone | 1000 ng/mL | 0.0% |
| Danazolo | 1000 ng/mL | 0.0% |
| Desametasone | 2000 ng/mL | 0.0% |
| DHEA | 1000 ng/mL | 0.0% |
| DHEA-S | 10 000 ng/mL | 0.0% |
| 5 α -diidrotosterone (DHT) | 500 ng/mL | 0.0% |
| Estradiolo | 1000 ng/mL | 0.0% |
| Estriolo | 100 ng/mL | 0.0% |
| Estrone | 1000 ng/mL | 0.0% |
| Etisterone | 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% |

Le seguenti sostanze non interferiscono con una distorsione $> \pm 15\%$ nel test Free Testosterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia indicata 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 [0,92 to 1,02] | -0,02 [-1,01 to 0,98] | 0,99 |
| Litio eparina | 0,99 [0,97 to 1,02] | -0,01 [-0,40 to 1,02] | 1,00 |
| Sodio eparina | 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. 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. 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. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso di questi kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o ani devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e/o strisce (Piastrine di Microtitolazione) di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usi i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- Utilizzi i dispositivi di protezione individuale (DPI) appropriati quando usa i reagenti forniti.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300® come conservante. Eviti il contatto con la pelle o le membrane mucose.
- Il TMB è un reagente irritante che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la pelle. Eviti l'ingestione, l'inalazione, il contatto con la pelle o con gli occhi.
- La soluzione bloccante è una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso, corrosivo e può essere tossico se ingerito. Eviti il contatto con la pelle e gli occhi per evitare ustioni chimiche.
- Eviti l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ alla luce solare, ai metalli e agli ossidanti. Non congelare la soluzione.
- L'importanza clinica della determinazione del testosterone libero può non essere stabilita se il paziente è in trattamento con cortisone o steroidi naturali o sintetici.
- Se il liquido non viene rimosso completamente dai pozzetti, ciò può influenzare l'accuratezza del test e/o aumentare lo sfondo. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi ELISA automatizzati, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia costante per la riproducibilità. Il pipettaggio dei campioni non deve durare più di 10 minuti per evitare la deriva del dosaggio. Se ci vogliono più di 10 minuti, segua lo stesso ordine di utilizzo. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose/risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta di TMB avvia la reazione cinetica che viene terminata con l'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, l'aggiunta della soluzione di substrato e della soluzione di stop deve essere effettuata durante la manipolazione, per eliminare eventuali errori durante la reazione.
- Seguire le istruzioni per l'uso per eseguire il controllo di qualità nei laboratori medici, analizzando i controlli e i sieri.
- Per la ricostituzione e la conservazione dei reagenti è necessaria un'elevata precisione.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolitici non devono essere utilizzati nel test.
- I lettori di micropiastre misurano in verticale. Non tocchi il fondo dei pozzetti.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

16.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali e normative nazionali e regionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

17. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF

DNOV009

Free Testosterone

(96 determinazioni)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

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. USO PREVISTO

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).

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

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

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placas de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-Testosterona y vienen empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 botella que contiene 15 mL de ácido sulfúrico 0,15 M (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado:** 1 botella que contiene 15 mL de Testosterona marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 botella que contiene 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (H_2O_2 -TMB 0,26 g/L) (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 botella de 50 mL tampón fosfato concentrado 10x 0,2 M, pH 7.4.

- **Control A:** 1 botella que contiene 1 mL de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Control B:** 1 botella que contiene 1 mL de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Estándares:** 6 botellas, 1 mL cada una

| | |
|-------------|-------------|
| Estándar 0: | 0,0 pg/mL |
| Estándar 1: | 0,2 pg/mL |
| Estándar 2: | 1,0 pg/mL |
| Estándar 3: | 4,0 pg/mL |
| Estándar 4: | 20,0 pg/mL |
| Estándar 5: | 100,0 pg/mL |

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de Placas de Microtitulación ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Incubador a 37 °C
- Equipo manual o automático para el lavado de las Placas de Microtitulación
- Pipetas
- Mezclador de rotación
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad. Una vez abierto, el kit es estable a 2...8 °C durante 6 meses.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y patrones a temperatura ambiente (22...28 °C) antes de iniciar la ejecución de la prueba! Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2...8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-Testosterona. Se deben conservar a oscuras a una temperatura de entre 2...8 °C. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C. Después del primer uso sigue siendo estable por otros 6 meses si se almacenan a 2...8 °C.*

6.2. Conjugado

El Conjugado Testosterona-HRP listo para usar.

6.3. Estándares

Antes de su uso mezclar suavemente por 5 minutos con un mezclador rotatorio. Los estándares están listos para ser usados. Después del primer uso sigue siendo estable por otros 6 meses si se almacenan a 2...8 °C.

6.4. Controles

Antes de su uso mezclar suavemente por 5 minutos con un mezclador rotatorio. Las botellas contienen 1 mL de una solución de control específica para cada lote, lista para su uso. La concentración está indicada en la etiqueta.

6.5. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 mL de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.6. Solución de parada

El frasco contiene 15 mL de solución de ácido sulfúrico 0,15 M. Esta solución está lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

6.7. 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. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN 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...8 °C | 24 horas |
| Ciclos de congelación/descongelación | 1 ciclo |

8. PROCEDIMIENTOS

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente el protocolo de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| 1 pozo (por ejemplo, A1) | para el blanco sustrato |
| 2 pozos (por ejemplo, B1+C1) | para el estándar 0 |
| 2 pozos (por ejemplo, D1+E1) | para el estándar 1 |
| 2 pozos (por ejemplo, F1+G1) | para el estándar 2 |
| 2 pozos (por ejemplo, H1+A2) | para el estándar 3 |
| 2 pozos (por ejemplo, B2+C2) | para el estándar 4 |
| 2 pozos (por ejemplo, D2+E2) | para el estándar 5 |
| 2 pozos (por ejemplo, F2+G2) | para el control A |
| 2 pozos (por ejemplo, H2+A3) | para el control B |

Se recomienda determinar los estándares, controles y muestras de pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

Ajuste el incubador a 37 °C.

1. Agregue 20 µL de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos. Agregue 100 µL de conjugado a cada pocillo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
2. Cubra los pozos con la lámina autoadhesiva incluida en el paquete.
3. **Incuba por 1 hora a 37 °C**
4. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y los pozos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. 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.

Lavado automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

5. Agregue 100 µL de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
6. **Incuba durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
7. Agregue 100 µL de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la Placa de Microtitulación.
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.
8. Leer la absorbancia a 450 nm frente a una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de Placas de Microtitulación de ELISA a **cero** usando el **substrato blanco en el pozo A1**.

Si - por razones técnicas - el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del substrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!

Mida la absorbancia de todos los pocillos a **450 nm** en relación con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o el blanco en un plazo de 5 minutos. Registre los valores de absorbancia de cada estándar y muestra de paciente.

Cuando sea necesario, calcule el **valor media de la absorbancia** de los duplicados.

9. 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 estándar 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 estándar 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:

$$\text{pg/mL} = \text{pmol/L} \times 0,289$$

10. CONTROL DE CALIDAD

Las buenas 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.

Recomendamos a 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 *Certificate of Analysis (CoA)* 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.

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 DE REFERENCIA

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. CARACTERÍSTICA ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

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

14.1. Sensibilidad analítica

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 14.5.

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 $\pm 15\%$.

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. Reactividad

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

| Reaccionante cruzado | Concentración probada (unidad) | 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 % |
| Dexametasona | 2000 ng/mL | 0,0 % |
| DHEA | 1000 ng/mL | 0,0 % |
| DHEA-S | 10000 ng/mL | 0,0 % |
| 5 α -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. LIMITACIONES DEL ENSAYO

- 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. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinados para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes de continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipeteo las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- Utilizar el equipo de protección personal adecuado mientras se trabaja con los reactivos suministrados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300[®] 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.
- Evitar la exposición del sustrato TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metal, u oxidantes. No congelar la solución.
- El tratamiento del paciente con cortisona, esteroides naturales o sintéticos pueden afectar la determinación de la testosterona libre.
- 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 de ELISA, 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 plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción 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.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

16.1. Consideraciones para El Descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

17. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF

DNOV009


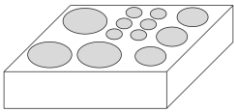


Free Testosterone

(96 Determinations)







BIBLIOGRAPHY/BIBLIOGRAPHIE/BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA

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

PACKAGING MATERIALS / MATERIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE

| | | | |
|--|--|--|---|
|  PAP 21 |  PAP 21 |  PAP 22 | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">MTP</div>  ALU / LDPE 90 |
|--|--|--|---|

SYMBOLS KEY / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS

| | |
|---|--|
|  | Manufactured by / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por |
| IVD | In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro |
| LOT | Lot Number / Numéro de lot / Lotto/Numero de lote |
|  | Expiration Date / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad |
|  | Storage Temperature / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento |
|  | Keep away from sunlight / Protéger de rayonnement solaire / Tenere lontano dalla luce del sole / Mantener alejado de la luz solar |
| CE | CE Mark / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE |
| REF | Catalogue Number / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo |
|  | Consult Instructions for Use / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso |
| MTP | Microtiterplate / Plaque de Microtitrage / Piastra di Microtitolazione / Placa de Microtitulación |
| CONJ | Conjugate / Conjugué / Coniugato / Conjugado |
| CONTROL A | Control A/ Contrôle A/ Controllo A / Contro A |
| CONTROL B | Control B / Contrôle B / Controllo B / Contro B |
| CAL | Calibrator resp. Standard / Calibrateur resp Étalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o Estándar |
| SOLN STOP | Stop solution / Solution stop / Soluzione bloccante / Solución de parada |
| SUB TMB | TMB Substrate solution / Substrat TMB / soluzione substrato TMB / solución substrato TMB |
| WASH BUF 10x | Washing solution 10x concentrated / Solution de lavage concentré 10 x / soluzione di lavaggio concentrazione x10 / solución de lavado concentrado x10 |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests |

**SUMMARY OF TEST PROCEDURE / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST /
SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA**

SCHEME OF THE ASSAY

Free Testosterone

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

| | Substrate blank | Standard 0 - 5 | Controls | Sample |
|--|-----------------|----------------|----------|--------|
| Standard 0 - 5 | - | 20 µL | - | - |
| Controls | - | - | 20 µL | - |
| Sample | - | - | - | 20 µL |
| Conjugate | - | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 °C Wash each well three times with 300 µL diluted wash solution (if you use automated equipment wash the wells at least 5 times) | | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark | | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake the microplate gently. Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes. | | | | |



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Date of issue: 2024-03-15

DNOV009_Free_TESTO_IFU_rev01_fromLot_6179AN