

Product information

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



User's Manual

Testosterone free ELISA

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



REF DE2924

 96 wells

*Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.*

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

1.	INTENDED USE.....	3
2.	CLINICAL SIGNIFICANCE.....	3
3.	PRINCIPLE.....	3
4.	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION.....	4
5.	WARNINGS.....	4
6.	PRECAUTIONS.....	5
7.	PROCEDURE.....	6
8.	QUALITY CONTROL.....	7
9.	RESULTS.....	7
10.	REFERENCE VALUES.....	7
11.	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS.....	8
12.	WASTE MANAGEMENT.....	8
13.	BIBLIOGRAPHY.....	8
14.	TROUBLESHOOTING.....	9
1.	DESTINAZIONE D'USO.....	10
2.	SIGNIFICATO CLINICO.....	10
3.	PRINCIPIO DEL METODO.....	10
4.	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE.....	11
5.	AVVERTENZE.....	11
6.	PRECAUZIONI.....	12
7.	PROCEDIMENTO.....	13
8.	CONTROLLO QUALITA'.....	14
9.	RISULTATI.....	14
10.	VALORI DI RIFERIMENTO.....	14
11.	PARAMETRI CARATTERISTICI.....	15
12.	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO.....	15
13.	BIBLIOGRAFIA.....	15
14.	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING.....	16
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	17

1. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Free Testosterone concentration in human serum or plasma.

Free Testosterone kit is intended for laboratory use only.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone is a steroid hormone from the androgen group. Testosterone is primarily secreted in the testes of males and the ovaries of females although small amounts are secreted by the adrenal glands. It is the principal male sex hormone and an anabolic steroid. In both males and females, it plays key roles in health and well-being.

Only a small percentage (< 1%) of circulating testosterone exists as unbound or free testosterone. The majority, approximately 60%, is bound to SHBG with high affinity, while the remainder is loosely bound to albumin. Both the albumin-bound and free fractions may be biologically active, while SHBG effectively inhibits testosterone action.

Testosterone effects can be classified as *virilizing* and *anabolic* effects. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs.

Testosterone levels decline gradually with age in men.

Measurement of the free or unbound fraction of serum testosterone has been proposed as a means of estimating the physiologically bioactive hormone. Free testosterone levels are elevated in women with hyperandrogenism associated with hirsutism in the presence or absence of polycystic ovarian disease. In addition, free testosterone measurements may be more useful than total testosterone in situations where SHBG is increased or decreased (e.g. hypothyroidism and obesity).

3. PRINCIPLE

Testosterone in the blood is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin). Only the measurement of Free Testosterone (< 1% of Total Testosterone) permits the estimating of the hormone biologically active.

Free Testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) present in the Conjugate for binding to the antibodies anti-Testosterone coated on the microplate (solid phase). The Testosterone bound to proteins does not take part to this reaction, so it is washed away during the washing step (for total Testosterone measurement the ELISA Demeditec "Testosterone" kit is available).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (acidic solution) is added.

The color intensity is inversely proportional to the Free Testosterone concentration in the sample.

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

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

1.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. **Free Testosterone Standard** (6 vial, 1 mL each) Standard 0 - 5
2. **Free Testosterone Control** (1 vial, 1 mL)
Control concentration is lot-specific and is indicated on the Certificate of Analysis
3. **Conjugate** (1 vial, 15 mL)
Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
4. **Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate
5. **TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)
6. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Acidic solution 0.3 N (*avoid any skin contact*)
7. **10X Conc. Wash Solution** (1 vial, 50 mL)
NaCl 160 g/L; Tween-20 10 g/L; 0.2M Phosphate buffer, pH 7.4

1.2. Reagents necessary not supplied

- Distilled water.

1.3. Auxiliary materials and instrumentation

- Automatic dispenser.
- Microplates reader (450 nm)

Note

Store all reagents at 2-8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use. Once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

5. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted acidic solution. Acidic solution is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Free Testosterone from 0.06 pg/mL to 100.0 pg/mL.
- The clinical significance of Free Testosterone determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

7. PROCEDURE**1.4. Preparation of the Standards (S0...S5)**

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

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

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

Once opened, the Standards are stable 6 months at 2-8°C.

1.5. Preparation of the Sample

The determination of Free Testosterone can be performed in human serum or plasma.

Store specimen at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

The Control is ready for use.

1.6. Preparation of the Wash Solution

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

1.7. Procedure

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

Reagent	Standard	Sample/ Control	Blank
Standard S0-S5	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank within 5 minutes.			

8. QUALITY CONTROL

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

9. RESULTS

1.8. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (S0-S5) and of each sample.

1.9. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Standards (S0-S5) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

1.10. Calculation of Results

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

10. REFERENCE VALUES

Serum concentrations of Free Testosterone are within the following ranges:

	Median	Mean \pm 1SD pg/mL	Range pg/mL
Male	14	13,0 \pm 7,0	4,5 - 42
Female			
Ovulating	1,3	1,4 \pm 0,9	ND - 4,1
Oral contraceptives	0,9	1,1 \pm 0,6	0,3 - 2,0
Post-menopausal	0,8	0,9 \pm 0,5	0,1 - 1,7

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

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

1.11. Precision

1.11.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (15x) the measurement of three different serum samples in the same assay. The within assay variability is $\leq 10\%$.

1.11.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurement of five different control sera and two serum samples in 10 different assays. The between assay variability is $\leq 10\%$.

1.12. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Free Testosterone that can be distinguished from the Standard 0 is 0.06 pg/mL.

1.13. Specificity

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

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

Analyte	% Cross reactivity
Testosterone	100
DHT	0,00008
Androstenedione	0,0043
Androsterone	0,00029
DHEA-S	0,00007
Cortisol	< 0,00001
Cortisone	< 0,00001
17 β Estradiol	0,00005
Estrone	< 0,00001
Prednisone	< 0,00001
17 α Ethynilestradiol	< 0,00001
Norgestrel	0,00001
Danazol	< 0,00001
Aldosterone	< 0,00001
Sodium Citrate	< 0,00001
EDTA	< 0,00001
Heparin	< 0,00001

1.14. RIA Correlation

Demeditec Free Testosterone ELISA was compared to a commercially available Free Testosterone RIA (DPC-Coat a Count) kit. Serum samples of 24 females and 17 males were analysed according to both test systems.

The linear regression curve was calculated

$$(\text{FT Demeditec}) = 0.957 \cdot (\text{FT RIA}) + 0.953$$

$$r^2 = 0.937$$

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

13. BIBLIOGRAPHY

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

14. TROUBLESHOOTING / ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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

1. DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Testosterone Libero nel siero o plasma umano.
Il kit Free Testosterone è destinato al solo uso di laboratorio.

2. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

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

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

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del Testosterone libero presente nel campione.

La concentrazione di Testosterone libero nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

1.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. **Free Testosterone Standards** (6 flaconi, 1 mL ciascuno) Standard 0 - 5
2. **Free Testosterone Control** (1 flacone, 1 mL)
La concentrazione del Controllo è lotto-specifica ed è indicata sul Certificato di Analisi
3. **Conjugate** (1 flacone, 15 mL)
Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)
4. **Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra
5. **TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
6. **Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido soluzione 0,3 N (*evitare il contatto con la pelle*)
7. **10X Conc. Wash Solution** (1 flacone, 50 ml)
NaCl 160 g/L; Tween-20 10 g/L, 0.2M Phosphate buffer, pH 7,4

1.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

- Acqua distillata.

1.3. Materiale e strumentazione ausiliare

- Dispensatori automatici.
- Lettore per micropiastre (450 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

5. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non usare internamente nè esternamente su esseri umani o animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una acido soluzione diluito. L'acido soluzione è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Testosterone libero da 0,06 pg/mL a 100,0 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Testosterone.

6. PRECAUZIONI

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

7. PROCEDIMENTO**1.4. Preparazione dei Standards (S0...S5)**

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per 5 minuti.

I Standards sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Testosterone:

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

Stabili 6 mesi a 2÷8°C dall'apertura dei flaconcini

1.5. Preparazione del campione

La determinazione del Testosterone si effettua su siero o plasma umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Il Controllo è pronto all'uso.

1.6. Preparazione della Wash Solution

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

1.7. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S0-S5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione /Controllo	Bianco
Standard S0-S5	20 µL		
Campione /Controllo		20 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco entro 5 minuti.			

8. CONTROLLO QUALITA'

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

9. RISULTATI**1.8. Estinzione Media**

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (S0-S5) e di ogni campione.

1.9. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Standard (S0-S5) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

1.10. Calcolo dei risultati

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

10. VALORI DI RIFERIMENTO

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

	Mediana	Media \pm 1SD pg/mL	Range pg/mL
Uomini	14	13,0 \pm 7,0	4,5 - 42
Donne			
Ovulazione	1,3	1,4 \pm 0,9	ND - 4,1
Contraccettivi orali	0,9	1,1 \pm 0,6	0,3 - 2,0
Post-menopausa	0,8	0,9 \pm 0,5	0,1 - 1,7

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

11. PARAMETRI CARATTERISTICI**1.11. Precisione****1.11.1. Intra-Assay**

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (15x) la misura di tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è $\leq 10\%$.

1.11.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la concentrazione di cinque differenti sieri di controllo e due campioni sierici. La variabilità inter-assay è $\leq 10\%$.

1.12. Sensibilità

La concentrazione minima di Testosterone libero misurabile che può essere distinta dal Standard 0 è 0,06 pg/mL.

1.13. Specificità

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

Analita	% Cross reattività
Testosterone	100
DHT	0,00008
Androstenedione	0,0043
Androsterone	0,00029
DHEA-S	0,00007
Cortisolo	< 0,00001
Cortisone	< 0,00001
17 β Estradiolo	0,00005
Estrone	< 0,00001
Prednisone	< 0,00001
17 α Etinilestradiolo	< 0,00001
Norgestrel	0,00001
Danazolo	< 0,00001
Aldosterone	< 0,00001
Sodio Citrato	< 0,00001
EDTA	< 0,00001
Eparina	< 0,00001

1.14. Correlazione con RIA

Il kit Free Testosterone Demeditec è stato comparato con il kit Free Testosterone RIA (DPC-Coat a Count) disponibile in commercio. Sono stati testati 24 campioni sierici femminili e 17 maschili.

La curva di regressione è:

$$(FT \text{ Demeditec}) = 0,957 \cdot (FT \text{ RIA}) + 0,953$$

$$r^2 = 0,937$$

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

13. BIBLIOGRAFIA

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

14. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI / ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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










Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità