

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# Testosterone free ELISA



**DE2924**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**CONTENTS / CONTENUTO / CONTENIDO**

1.	INTENDED PURPOSE.....	4
2.	CLINICAL SIGNIFICANCE.....	4
3.	PRINCIPLE OF THE METHOD.....	4
4.	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION.....	5
5.	WARNINGS.....	5
6.	PRECAUTIONS.....	6
7.	REAGENT STORAGE AND STABILITY.....	6
8.	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....	6
9.	PROCEDURE.....	7
10.	QUALITY CONTROL.....	8
11.	CALCULATION OF RESULTS.....	8
12.	MEASURING RANGE.....	8
13.	METROLOGY AND TRACEABILITY.....	8
14.	EXPECTED VALUES.....	9
15.	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
16.	LIMITATIONS OF USE.....	11
17.	WASTE MANAGEMENT.....	11
18.	BIBLIOGRAPHY.....	11
19.	PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT.....	11
1.	DESTINAZIONE D'USO (INTENDED PURPOSE).....	12
2.	RILEVANZA CLINICA.....	12
3.	PRINCIPIO DEL METODO.....	12
4.	REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE.....	13
5.	AVVERTENZE.....	13
6.	PRECAUZIONI.....	14
7.	CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI.....	14
8.	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	15
9.	PROCEDURA.....	15
10.	CONTROLLO QUALITÀ.....	16
11.	CALCOLO DEI RISULTATI.....	16
12.	INTERVALLO DI MISURAZIONE.....	17
13.	METROLOGIA E TRACCIABILITÀ.....	17
14.	VALORI ATTESI.....	17
15.	CARATTERISTICHE DI AZIONE.....	17
16.	LIMITAZIONI D'USO.....	20
17.	GESTIONE DEI RIFIUTI.....	20
18.	BIBLIOGRAFIA.....	20
19.	RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO.....	20

---

1.	FINALIDAD PREVISTA (INTENDED PURPOSE) .....	21
2.	IMPORTANCIA CLÍNICA .....	21
3.	PRINCIPIO DEL MÉTODO .....	21
4.	REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN .....	22
5.	ADVERTENCIAS.....	22
6.	PRECAUCIONES .....	23
7.	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS.....	24
8.	RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	24
9.	PROCEDIMIENTO .....	24
10.	CONTROL DE CALIDAD .....	25
11.	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	25
12.	RANGO DE MEDICIÓN .....	26
13.	METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD .....	26
14.	VALORES ESPERADOS .....	26
15.	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO .....	26
16.	LÍMITES DE USO .....	29
17.	GESTIÓN DE RESIDUOS.....	29
18.	BIBLIOGRAFÍA.....	29
19.	RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA.....	29
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	32

## 1. INTENDED PURPOSE

### **For *In Vitro* Diagnostic Use. For Laboratory Professional Use**

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

## 2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone is found in circulation predominantly linked to carrier proteins, the most common of which being sex-hormone binding globulin (SHBG). Testosterone plays a key role in the development of primary and secondary sexual characteristics in males and is involved in the production of female sexual hormones. Only 1 – 2% of testosterone in circulation is not bound to any protein and is biologically active – this is referred to as ‘free testosterone’ (FT). Bioavailable testosterone refers to the sum of FT and the testosterone bound to serum albumin, since it is bound with low affinity and readily able to dissociate to become available for its biological function. In males elevated levels of testosterone are associated with several conditions such as, early (precocious) puberty, congenital adrenal hyperplasia (CAH), androgen insensitivity syndrome (AIS), steroid use and testicular or adrenal tumours. Whereas the major causes of suppressed levels include Klinefelter’s syndrome, testicular damage, pituitary disorders etc. In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilising conditions including adrenal tumours and polycystic ovarian syndrome (PCOS). These clinical conditions are associated with either a lack or excess of testosterone in circulation (hypoandrogenism or hyperandrogenism). Diagnosis of these disorders involve the quantification of total testosterone (TT) in association with other clinical evidence and laboratory data. However, clinical manifestations of androgen disorders are often associated with normal levels of TT. In such cases, additional information may be gained by the assessment of the biologically active, FT level. Several androgen disorders can be caused by alteration of SHBG production which affects the levels of FT available in serum. Measurement of FT can be considered useful in the diagnosis of several conditions including androgen deficiency in men and androgen excess in women<sup>1</sup>. Assessment of free testosterone levels may prove beneficial<sup>2</sup> 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 day<sup>3</sup>. 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 function<sup>4</sup>.

## 3. PRINCIPLE OF THE METHOD

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 microplate (solid phase). After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 4.1. Reagents and materials supplied in the kit

- CAL 0 – 5** Calibrators (6 vial, 1 mL each); Calibrator 0: refer to section 5.
- CONTROL 1 & 2** Controls (2 vials, 1 mL each), Control 1 and 2; refer to section 5. Controls concentration is indicated on the Certificate of Analysis
- ENZ CONJ** Conjugate (1 vial, 15 mL). Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP); ProClin >0.0015% and BSA
- SORB MT** Coated Microplate (1 breakable microplate). Anti-Testosterone antibody adsorbed on microplate
- SUB TMB** TMB Substrate (1 vial, 15 mL). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0.26 g/L) (*avoid any skin contact*). ProClin <0.0015%
- STOP SOLN** Stop Solution (1 vial, 15 mL). Sulphuric acid 0.15M (*avoid any skin contact*)
- WASH SOLN 10x** 10x Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL) 0.2M Phosphate buffer pH 7.4; ProClin >0.0015%

### 4.2. Materials required but not provided

Distilled water



### 4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

## 5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material. Calibrators and Controls contain Human Serum.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious. Calibrators 1 to 5 and Controls contain BSA (Bovine Serum Albumin)
- Some reagents (calibrator 0, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) as preservative. Some reagents (Calibrator 1-5 and TMB Substrate) contain ProClin™ 300 (<0,0015%). Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]**

Skin sensitivity, Category 1



Contains: ProClin 300

Warning

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators and controls) contain small amounts of Sodium Azide ( $\text{NaN}_3$ ) <0.1% which may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

## 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.
- 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 date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- 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, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

## 7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

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

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

## 8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

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

## 9. PROCEDURE

### 9.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

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

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

The Controls are ready to use.

### 9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

### 9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "Conc. Wash Solution 10X" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

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

### 9.4. Preparation of Samples

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

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

### 9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate for 1 hour at 37°C (± 0.5°C).			
Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution			
<b>Important note:</b> 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.			
<b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently.			
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 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. The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate. Demeditec recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range. When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories<sup>5</sup>.

## 11. 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 Calibrator 0 is required**.

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

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

### Conversion of units

To convert results to SI units:

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

To convert results to mass units:

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

## 12. 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)”.

## 13. 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.



#### 14. EXPECTED VALUES

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

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

#### 15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

##### 15.1. Detection Capability

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

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

##### 15.2. Trueness

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

##### 15.3. 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%

**15.4. 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  $\pm 15\%$ .

**15.5. Method comparison**

The Testosterone free 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

**15.6. 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- $\beta$ -hydroxy-testosterone	10 ng/mL	0.2%
17 $\alpha$ OH-Progesterone	500 ng/mL	0.0%
Aldosterone	3000 ng/mL	0.0%
Androstenedione	100 ng/mL	0.0%
Cortisol	1000 ng/mL	0.0%
Cortisone	1000 ng/mL	0.0%
Danazol	1000 ng/mL	0.0%
Dexamethasone	2000 ng/mL	0.0%
DHEA	1000 ng/mL	0.0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0.0%
5 $\alpha$ -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

**15.7. 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

**16. LIMITATIONS OF USE**

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays<sup>6</sup>. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

**17. WASTE MANAGEMENT**

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

**18. BIBLIOGRAPHY**

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

**19. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT**

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority. The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found on the company website:

[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

## 1. DESTINAZIONE D'USO (INTENDED PURPOSE)

### Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale in laboratorio

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

## 2. RILEVANZA CLINICA

Il testosterone circolante si coniuga principalmente a proteine di trasporto, tra cui la più comune è la globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG). Il testosterone svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dei caratteri sessuali maschili primari e secondari ed è coinvolto nella produzione di ormoni sessuali femminili. Solo l'1–2% del testosterone circolante non è legato ad alcuna proteina ed è biologicamente attivo; viene denominato "testosterone libero" (FT). Il testosterone biodisponibile si riferisce alla somma del FT e del testosterone legato alla sieralbumina, poiché è associata a bassa affinità e facilmente in grado di dissociarsi per diventare disponibile per la sua funzione biologica. Nei soggetti di sesso maschile, livelli elevati di testosterone sono associati a diverse condizioni quali pubertà precoce, iperplasia surrenale congenita (CAH), sindrome da insensibilità agli androgeni (SIA), utilizzo di steroidi e tumori testicolari o surrenali. Mentre le cause principali della soppressione del testosterone includono la sindrome di Klinefelter, danni ai testicoli, disturbi della ghiandola ipofisaria, ecc. Ne soggetti di sesso femminile di qualsiasi età, livelli elevati di testosterone possono essere associati a una serie di condizioni virilizzanti, inclusi tumori surrenali e la sindrome dell'ovaio policistico (SOPC). Queste condizioni cliniche sono associate a mancanza o eccesso di testosterone in circolazione (ipoandrogenismo o iperandrogenismo). La diagnosi di questi disturbi comporta la quantificazione del testosterone totale (TT) in associazione ad altre evidenze cliniche e dati di laboratorio. Tuttavia, le manifestazioni cliniche dei disturbi a carico degli androgeni sono spesso associate a livelli normali di TT. In questi casi, è possibile ottenere ulteriori informazioni dalla valutazione del livello di FT biologicamente attivo. Diversi disturbi a carico degli androgeni possono essere causati da un'alterazione della produzione di SHBG che influisce sui livelli di FT disponibili nel siero. La misurazione di FT può essere considerata di utilità nella diagnosi di varie condizioni, tra cui la carenza di androgeni negli uomini e l'eccesso di tali ormoni nelle donne<sup>1</sup>. La misurazione dei livelli di testosterone libero può essere utile<sup>2</sup> 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 giornata<sup>3</sup>. 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 cognitive<sup>4</sup>.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Free Testosterone ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui il testosterone libero (antigene) nel campione compete con il testosterone antigenico coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame al numero limitato di anticorpi anti testosterone rivestiti sulla micropiastra (fase solida). Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato ( $H_2O_2$ ) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto ( $H_2SO_4$ ). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone libero nel campione. La concentrazione di testosterone libero nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

## 4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

- CAL 0 – 5** Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno). Fare riferimento alla sezione 5.
- CONTROL 1 & 2** Controls (2 flaconi, 1 mL ciascuno). Fare riferimento alla sezione 5. Control 1 + 2. La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi
- ENZ CONJ** Conjugate (1 flacone, 15 mL). Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP); ProClin >0,0015% e BSA
- SORB MT** Coated Microplate (1 micropiastra breakable). Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra
- SUB TMB** TMB Substrate (1 flacone, 15 mL). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)  
ProClin <0,0015%
- STOP SOLN** Stop Solution (1 flacone, 15 mL). Acido solforico 0,15 M (*evitare qualsiasi contatto con la pelle*)
- WASH SOLN 10x** 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL). Tampone fosfato 0.2M pH 7,4; ProClin >0,0015%

### 4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

### 4.3. Materiali e strumentazione ausiliari


Erogatore automatico


Pipette di precisione

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

## 5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.

 Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato testato e risultato negativo per gli anticorpi dell'HIV 1 e 2, HbsAg e HCV. Nessun metodo di prova, tuttavia, può offrire la completa garanzia che HIV, HBV, HCV o altri agenti infettivi siano assenti. Pertanto, i calibratori e i controlli devono essere manipolati allo stesso modo del materiale potenzialmente infettivo. Calibratori e controlli contengono siero umano.

 Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Calibratori e controlli contengono BSA (siero albumina bovina).

- Alcuni reagent (calibrator 0, conjugate e wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Alcuni reagenti (CAL1 – 5 e TMB Substrate) contengono ProClin™ 300 (<0,0015%). Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori e controls) contengono piccole quantità di azoturo di sodio ( $\text{NaN}_3$ ) <0,1%, che può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La Stop Solution consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

## 6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

## 7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2–8 °C, al buio.

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

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

## 8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

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

I controlli sono pronti per l'uso.

## 9. PROCEDURA

### 9.1. Preparazione di calibratori e controlli

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

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

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

I controlli sono pronti per l'uso.

### 9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

### 9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

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

### 9.4. Preparazione dei campioni

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

I controlli sono pronti per l'uso.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

### 9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22–28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2–8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2–8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Campione/ Controllo		20 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 1 ora a 37 °C (± 0,5°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto; lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. <b>Nota importante:</b> durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. <b>Lavatore automatico:</b> se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare a temperatura ambiente (22±28 °C) per 15 minuti al buio.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

## 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 dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati. I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio. La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra. Demeditec raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio. Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi<sup>5</sup>.

## 11. 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.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.



**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:

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

**12. INTERVALLO DI MISURAZIONE**

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

Qualsiasi valore inferiore a 0,34 pg/mL (1,18 pg/L) deve essere refertato come "< 0,34 pg/mL (< 1,18 pmol/L)". Qualsiasi valore superiore a 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L) deve essere refertato come "> 70,0 pg/mL (242,9 pmol/L)".

**13. 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.

**14. VALORI ATTESI**

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

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

**15. CARATTERISTICHE DI AZIONE**

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

**15.1. Capacità di rilevamento**

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

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

**15.2. Esattezza**

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

**15.3. 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%

**15.4. 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  $\pm 15\%$ .

**15.5. Confronto del metodo**

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

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

**15.6. Specificità analitica**

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
11-ketotestosterone	100 ng/mL	0,1%
11-β-idrossi-testosterone	10 ng/mL	0,2%
17αOH-Progesterone	500 ng/mL	0,0%
Aldosterone	3.000 ng/mL	0,0%
Androstenedione	100 ng/mL	0,0%
Cortisolo	1.000 ng/mL	0,0%
Cortisone	1.000 ng/mL	0,0%
Danazolo	1.000 ng/mL	0,0%
Desametasone	2.000 ng/mL	0,0%
DHEA	1.000 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10.000 ng/mL	0,0%
5α-diidrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0,0%
Estradiolo	1.000 ng/mL	0,0%
Estriolo	100 ng/mL	0,0%
Estrone	1.000 ng/mL	0,0%
Etisterone	100 ng/mL	0,0%
Norgestrel	100 ng/mL	0,0%
Prednisone	1.000 ng/mL	0,0%
Pregnenolone	5.000 ng/mL	0,0%
Progesterone	1.000 ng/mL	0,0%
Testosterone propionato	1.000 ng/mL	0,0%

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

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

**15.7. Studio su siero-plasma**

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

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

## 16. 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*<sup>6</sup>. 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.

## 17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

## 18. 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

## 19. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale. Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

## 1. FINALIDAD PREVISTA (INTENDED PURPOSE)

### Para uso en diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional de laboratorio

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 de una población adulta. 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).

## 2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La testosterona se encuentra en circulación predominantemente vinculada a las proteínas portadoras, siendo la más común de ellas la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona representa un papel fundamental en el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias en los hombres, y participa en la producción de las hormonas sexuales femeninas. Solo 1-2 % de la testosterona en circulación no está vinculada a ninguna proteína y es activa desde el punto de vista biológico, lo que se denomina «testosterona libre» (FT). La testosterona biodisponible es la suma de la FT y de la testosterona vinculada a la albúmina sérica, ya que se une con baja afinidad y puede disociarse fácilmente con el fin de estar disponible para realizar su función biológica. En los hombres, los niveles elevados de testosterona están asociados a diferentes afecciones como la pubertad temprana (precoz), la hiperplasia adrenal congénita (CAH), el síndrome de insensibilidad de los andrógenos (SIA), el uso de esteroides y los tumores testiculares o adrenales. Las principales causas de los niveles inhibidos son el síndrome de Klinefelter, las lesiones testiculares, los trastornos hipofisarios, etc. En las mujeres de todas las edades, los niveles elevados de testosterona pueden asociarse a diferentes afecciones virilizantes, como los tumores adrenales y el síndrome de ovario poliquístico (SOP). Estas afecciones clínicas están asociadas a la falta o al exceso de testosterona en circulación (hipoandrogenismo o hiperandrogenismo). El diagnóstico de estos trastornos implica la cuantificación de la testosterona total (TT) en relación con otras pruebas clínicas y datos de laboratorio. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de los desequilibrios de los andrógenos se asocian con frecuencia a niveles normales de TT. En estos casos, se puede obtener información adicional mediante la evaluación del nivel de FT que está activo desde el punto de vista biológico. Varios desequilibrios de los andrógenos pueden ser causados por la alteración de la producción de SHBG, que afecta a los niveles de FT presentes en el suero. La medición de FT puede considerarse útil en el diagnóstico de algunas afecciones como la deficiencia de andrógenos en hombres y el exceso de andrógenos en mujeres<sup>1</sup>. La evaluación de los niveles de testosterona libre puede resultar beneficiosa<sup>2</sup> 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 día<sup>3</sup>. 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 cognitiva<sup>4</sup>.

## 3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

#### 4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

##### 4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. **CAL 0 – 5** Calibradores (6 viales, 1 mL cada uno); Consulte la sección 5.
2. **CONTROL 1 & 2** Control (2 viales, 1 mL cada uno) Control 1 & Control 2; Consulte la sección 5. La concentración de los controles se indica en el certificado de análisis
3. **ENZ CONJ** Conjugado (1 vial, 15 mL) Testosterona conjugada con peroxidasa de rábano (HRP); ProClin >0,0015% y BSA
4. **SORB MT** Microplaca(1 microplaca que se puede romper) Anticuerpo de antitestosterona absorbido en microplaca
5. **SUB TMB** Substrato TMB (1 vial, 15 mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*); ProClin <0,0015%
6. **STOP SOLN** Solución de parada (1 vial, 15 mL) Ácido sulfúrico 0,15M (*evitar el contacto con la piel*)
7. **WASH SOLN 10x** Solución de lavado conc. 10X (1 vial, 50 mL) 0.2M Tampón fosfato, pH 7,4. ProClin >0,0015%

##### 4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada



##### 4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

#### 5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos ha sido sometido a pruebas que han dado resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, el HbsAg y el VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los calibradores y los controles deben manejarse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso. Calibradores y controles contienen suero humano.  
 El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEV, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos. Calibradores 1 – 5 y controles contienen BSA (albúmina suero bovina).
- Algunos reactivos (calibrador 0, conjugate y wash solution) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Algunos reactivos (CAL1 – 5 y TMB Substrate) contienen ProClin™ 300 (<0,0015%). Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- **Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]**

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores y controls) contienen pequeñas cantidades de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) <0,1%, que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La Stop Solution consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

## 6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.

- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

## 7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

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

## 8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

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

## 9. PROCEDIMIENTO

### 9.1. Preparación de calibradores y controles

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

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

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

Los controles están listos para su uso.

### 9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

### 9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «Conc. Wash Solution 10X» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

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

### 9.4. Preparación de las muestras

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

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.



### 9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Muestra/Control		20 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar durante 1 hora a 37 °C (± 0,5°C).			
Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
<b>Nota importante:</b> en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.			
<b>Lavadora automática:</b> si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar a temperatura ambiente (22÷28 °C) durante 15 minutos en la oscuridad.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca.			
Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

### 10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados. Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo. La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa. Demeditec recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio. Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control<sup>5</sup>.

### 11. 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 calibrador 0**.

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

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.#

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

### 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:

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

## 12. 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)».

## 13. 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.

## 14. VALORES ESPERADOS

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

	Número de sujetos	Mediana pg/mL	Intervalo de referencia (pg/mL)
<b>Varones</b>			
21 – 49 años	120	14,13	5,01 – 27,78
> 50 años	120	12,75	4,11 – 21,85
<b>Mujeres</b>			
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.

## 15. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

### 15.1. Capacidad de detección

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

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

### 15.2. Veracidad

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

**15.3. 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)	Intraprueba (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 %

**15.4. 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  $\pm 15$  %.

**15.5. 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

**15.6. Especificidad analítica**

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 %
17αOH-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 %
5α-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

**15.7. 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)
<b>SST</b>	0,97 [0,92 a 1,02]	-0,02 [-1,01 a 0,98]	0,99
<b>Heparina de litio</b>	0,99 [0,97 a 1,02]	-0,01 [-0,40 a 1,02]	1,00
<b>Heparina sódica</b>	0,93 [0,87 a 0,99]	-0,01 [-1,12 a 1,10]	0,99
<b>EDTA</b>	1,03 [0,97 a 1,08]	0,27 [0,74 a 1,28]	0,99

## 16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*<sup>6</sup>. 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.

## 17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

## 18. BIBLIOGRAFÍA

7. Shea JL, Wong PY, Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem.* 2014;63:59-84.
8. 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.
9. 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.
10. Rajfer J. Decreased Testosterone in the Aging Male. *Rev Urol.* 2003;5(suppl 1):S1–S2.
11. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
12. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33













## 19. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional. Se puede contactar con el fabricante a través de su servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)





## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	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
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta