

Instructions for use
Free Testosterone ELISA 2nd Generation

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

REF

AA E-1800

**IVD****CE**

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Free Testosterone by an enzyme immunoassay in human serum.
For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabelled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microplate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of free testosterone in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of free testosterone in patient samples and controls can be directly read.

The *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* kit utilizes a highly specific rabbit anti-testosterone polyclonal antibody at a low binding capacity ($K_{eq} \times$ concentration) to keep minimum disturbances of the testosterone-protein equilibrium. The other components in the test system are also optimized in order to not alter the original free testosterone concentration.

CLINICAL APPLICATIONS

Testosterone is a C-19 steroid secreted from the testis and the adrenal cortex in men and from the adrenal cortex and ovaries in women. Testosterone is also produced by peripheral tissues from androstenedione, which is of little physiological significance in men; in women however, about half of the circulating testosterone is derived from this origin. Testosterone measurements are used mainly for clinical evaluation of hypogonadism in males and hyperandrogenic states in females.

Testosterone circulates in the blood bound to three proteins: sex hormone binding globulin (60 - 80%), albumin and cortisol binding globulin. Only about 1 - 2 % of the total circulating testosterone remains unbound or free. Even though it is still under investigation, most researchers accept the free testosterone determination as a measure of the biologically active fraction. Free testosterone determinations are recommended to overcome the influences caused by variations in transport proteins on the total testosterone concentration.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A Standard curve must be established for every run.
7. The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of free testosterone in human serum. The kit is not calibrated for the determination of free testosterone in other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Samples reading higher than 60 pg/ml should not be diluted. Dilution will alter the equilibrium between free testosterone and serum proteins.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. No test method however, can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered as potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4 – 5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED


1. Precision pipettes to dispense 25, 50, 100, 150 and 350 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. A 37 °C incubator
5. Microplate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 11).

REAGENTS PROVIDED

- 1. AA E-0030** **WASH-CONC 10x** **Wash Buffer Concentrate – Requires Preparation x10**
Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.
- 2. AA E-0055** **SUBSTRATE** **TMB Substrate - Ready To Use.**
Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume: 16 ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopping Solution - Ready To Use.**

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
Volume: 6 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Hazards identification: 

H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and Controls- Ready To Use.

* Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration*	Volume/Vial
AA E-1801	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	0.5 ml
AA E-1802	STANDARD B	Standard B	0.1 pg/ml	0.5 ml
AA E-1803	STANDARD C	Standard C	1 pg/ml	0.5 ml
AA E-1804	STANDARD D	Standard D	5 pg/ml	0.5 ml
AA E-1805	STANDARD E	Standard E	20 pg/ml	0.5 ml
AA E-1806	STANDARD F	Standard F	60 pg/ml	0.5 ml
AA E-1851	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
AA E-1852	CONTROL 2	Control 2		0.5 ml

Contents: Vials containing testosterone in a human serum-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a precise quantity of testosterone equivalent to approximately 0, 0.1, 1, 5, 20 and 60 pg/ml * of free testosterone.

Storage: Refrigerate at 2 - 8 oC

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

5. AA E-1413 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer - Ready To Use.**

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 15 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.

6. AA E-1431 **96** **Rabbit Anti-Free Testosterone Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate - Ready To Use.**

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.
Storage: Refrigerate at 2 - 8 oC
Stability: 12 months or as indicated on label.

7. AA E-1840 **CONJUGATE-CONC 50x** **Free Testosterone-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – Requires Preparation x50**

Contents: Free Testosterone-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 300 µl/vial
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None**.

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the free testosterone-HRP conjugate and wash buffer .
2. Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 25 µl of each standard, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well. <i>(We recommend using a multichannel pipette).</i>
5. Gently shake the plate for 10 seconds .
6. Incubate the plate at 37 °C for 1 hour .
7. Wash the wells 3 times with 350 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry <i>(The use of a washer is recommended)</i> .
8. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
9. Incubate the plate at 37 °C for 10-15 minutes . <i>(or until Standard A attains dark blue colour for desired OD).</i>
10. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 8.
11. Read the plate on a microplate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution. <i>If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however this will not affect the results of patient/control samples.</i>

CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the standard curve.

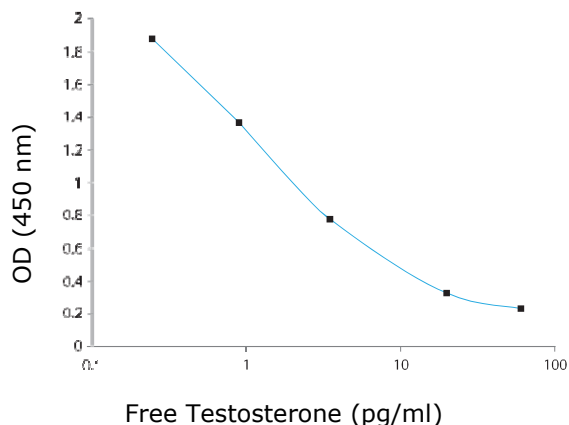
TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Standard	Mean OD (450 nm)	Value (pg/ml)
A	2.292	0
B	1.680	0.1
C	1.181	1
D	0.780	5
E	0.426	20
F	0.214	60
Unknown	1.066	1.59
Unknown	0.441	19.6

TYPICAL STANDARD CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results:



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of 64 replicates of a low value sample and from the LoB.

$$LoD = LoB + 1.645\sigma_S,$$

where σ_S is the standard deviation of the low value sample. σ_S was determined to be 0.0093 based on 64 measurements of a low value sample.

$$LoD = 0.0025 + (1.645 * 0.0093) = \mathbf{0.018 \text{ pg/ml.}}$$

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the **Free Testosterone ELISA 2nd Generation** kit with testosterone cross-reacting at 100%.

Steroid	% Cross Reactivity
Testosterone	100
5 α -DHT	3.5
Androstenedione	0.17
Progesterone	0.007
Androsterone	0.075
Aldosterone	<0.008
Cholesterol	<0.0001
Cortisone	0.0025
DHEA	0.071
DHEAS	0.0014
17 β -Estradiol	0.15
Estriol	<0.008
Pregnenolone	0.028

INTRA-ASSAY PRECISION

Five samples were assayed 24 times each on the same standard curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	CV %
1	2.24	6.7
2	3.81	6.4
3	13.6	6.0
4	13.7	5.9
5	23.7	4.8

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed twenty times in duplicate over a period of greater than ten days. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	CV %
1	3.53	8.1
2	13.8	11.5
3	23.3	6.9

COMPARATIVE STUDIES

The *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* Kit (y) was compared with a competitors Free Testosterone Coated Tube RIA Kit (x). The comparison of 60 serum samples yielded the following linear regression results:

$$y = 0.9362x \text{ (competitor)} + 3.8794, r = 0.97$$

EFFECT OF SEX HORMONE BINDING GLOBULIN (SHBG)

The purpose of this study was to investigate a possible interference caused by the binding of SHBG to the free testosterone-HRP conjugate. A charcoal-stripped human serum pool was spiked precisely with SHBG at concentrations ranging from 6.25 - 200 µg/ml and was assayed with the *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* Kit. Results tabulated below (in pg/ml):

SHBG Added	OD 450nm	Percent B/B ₀ (%)
0	2.37	100.0
6.25	2.37	99.9
12.5	2.34	98.7
50	2.36	99.5
200	2.27	95.6

The results showed % binding values between 95 - 100 % (B₀ = unspiked serum) even at higher than normal SHBG levels. In conclusion, the results showed that there was no significant binding by SHBG on the free testosterone-HRP conjugate.

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. The results of an expected range study with apparently normal healthy subjects yielded the following results (all values are reported in pg/ml).







Cohort Group; Gender/Age	N	95% Confidence Range	Absolute Range
Males / < 13	44	-	ND - 1.6
Males / 13 - 19	37	-	ND - 22.3
Males / 20 - 39	120	9.1 - 32.2	-
Males / 40 - 59	120	5.7 - 30.7	-
Males / ≥ 60	120	5.9 - 27.0	-
Females / < 13	63	-	ND - 1.3
Females / 13 - 19	17	-	0.2 - 2.0
Females / 20 - 39	120	0.1 - 6.3	-
Females / 40 - 59	120	0.2 - 4.1	-
Females / ≥ 60	60	0.5 - 3.9	-

REFERENCES

1. Winter SJ, et al. The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. *Clin Chem.* 1998; 44(10):2178–82.
2. Ooi DS, et al. Establishing Reference Interval for DPC’s Free Testosterone Radioimmunoassay. *Clin Biochem.* 1998; 31(1):15–21.
3. Marcus GJ, Dumford R. A Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Testosterone. *Steroids.* 1985; 46:975–86.
4. Joshi UM, et al. A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. *Steroids.* 1979; 34(1):35–46.
5. Swinkels LM, et al. Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. *Am Clin Biochem.* 1988; 25(Pt 4):354–9.
6. Swinkels LM, et al. A Symetric Dialysis Method for the Determination of Free Testosterone in Human Plasma. *Clin Chem Acta.* 1987; 165(2–3):341–9.
7. Ekins R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1990; 27(Pt 1):91–4.
8. Manni A, et al. Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(4):705–10.
9. Ekins R. The Science of Free Testosterone Measurement. *Proc UK NEQAS Meeting.* 1998; 3:35–9.
10. Longcope C, et al. Free Estradiol, Free Testosterone, and Sex Hormone-Binding Globulin in Perimenopausal Women. *J Clin Endo Metab.* 1987; 64(3):513–8.
11. Vermeulen A, et al. The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. *J Clin Endo Metab.* 1971; 33(5):759–67.
12. Paulson JD, et al. Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. *Am J Obs Gyneco.* 1977; 128(8):851–7.
13. Cumming DC, Wall SR. Non-Sex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(5):873–6.
14. Baxendale PM, et al. Salivary Testosterone: Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hyperandrogenic Women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1982; 16(6):595–603.
15. Biffignandi P, et al. Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. *Endocrinol Rev.* 1984; 5(4):498–513.
16. Wu CH. Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. *Obstet Gynecol.* 1982; 60(2):188–94.
17. Bamman BL, et al. Total and Free Testosterone During Pregnancy. *Am J Obsetet Gynecol.* 1980; 137(3):293–8.
18. Halpern EP, et al. Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. *Clin Chem.* 1980; 26:68.
19. Wheeler MJ. The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1995; 32(Pt 4):345–57.
20. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139–40.

Please use only the valid version of the instruction for use provided with the kit.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von freiem Testosteron in Humanserum durch Enzymimmunoassay. Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entstehen zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem enzymmarkierten Antigen (Konjugat). Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von freiem Testosteron in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Mengen von freiem Testosteron in den Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

Das Kit für freies Testosteron verwendet einen hochspezifischen polyklonalen Anti-Testosteron-Kaninchenantikörper bei niedriger Bindungskapazität ($K_{eq} \times \text{Konzentration}$), um die Störungen des Testosteron-Protein-Gleichgewichts zu minimieren. Die anderen Komponenten des Testsystems sind gleichfalls optimiert, um die ursprüngliche freie Testosteronkonzentration nicht zu verändern.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Testosteron ist ein C₁₉-Steroid, das bei Männern von Hoden und Nebennierenrinde, bei Frauen von Nebennierenrinde und Eierstöcken produziert wird. Testosteron wird auch in peripheren Geweben aus Androstendion gebildet, was bei Männern wenig physiologische Bedeutung hat, während bei Frauen etwa die Hälfte des zirkulierenden Testosterons aus dieser Quelle stammt. Testosteronmessungen werden vor allem für die klinische Beurteilung von Hypogonadismus bei Männern und hyperandrogene Zustände bei Frauen verwendet.

Im Blut ist Testosteron an drei Proteine gebunden: Sexualhormonbindendes Globulin (60–80%), Albumin und cortisolbindendes Globulin. Nur etwa 1–2% des gesamten zirkulierenden Testosterons sind frei. Auch wenn die Untersuchungen derzeit noch laufen, akzeptieren die meisten Forscher die Messung freien Testosterons als Maß für die biologisch aktive Fraktion. Messungen freien Testosterons werden empfohlen, um die Einflüsse durch Veränderungen der Transportproteine auf die Gesamttestosteronkonzentration auszublenden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
2. Kontrollmaterialien oder Serum-pools sollten mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einbezogen werden.
3. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
4. Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
12. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
13. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
14. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von freiem Testosteron in menschlichem Serum geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von freiem Testosteron in Speichel oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
2. Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Seren.
3. Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Proben mit Messwerten über 60 pg/ml sollten nicht verdünnt werden. Verdünnung verändert das Gleichgewicht zwischen freiem Testosteron und Serumproteinen.
5. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Etwa 0,1 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

PROBENVORBEHANDLUNG

Dieses Assay ist ein Direktsystem; es ist keine Probenvorbehandlung notwendig.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipetten für 25, 50, 100, 150 und 300 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
4. Ein 37-°C-Inkubator
5. Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher* (siehe Assayverfahren Schritt 11).

MITGELIEFERT REAGENZIEN

1. AA E-0030 WASH-CONC 10x Waschpufferkonzentrat – benötigt eine Vorbereitung x10

Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.


Volumen: 50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

2. AA E-0055 **SUBSTRATE** **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.
 Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.
 Volumen: 16 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.
 Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
 Volumen: 6 ml/Fläschchen
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
 Mögliche Gefahren: 

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.


4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig.

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
AA E-1801	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	0,5 ml
AA E-1802	STANDARD B	Standard B	0,1 pg/ml	0,5 ml
AA E-1803	STANDARD C	Standard C	1 pg/ml	0,5 ml
AA E-1804	STANDARD D	Standard D	5 pg/ml	0,5 ml
AA E-1805	STANDARD E	Standard E	20 pg/ml	0,5 ml
AA E-1806	STANDARD F	Standard F	60 pg/ml	0,5 ml
AA E-1851	CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,5 ml
AA E-1852	CONTROL 2	Kontrolle 2		0,5 ml

Inhalt: Fläschchen enthalten Testosterone in einem menschlichen Serum-basierten Puffer in einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.
 Hergestellt durch Dotieren von Serum mit einer genauen Menge von Testosteron entsprechend etwa 0; 0,1; 1; 5; 20 und 60 pg/ml an freiem Testosteron.
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.


5. AA E-1413 **ASSAY-BUFF** **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig.
 Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 15 ml/Fläschchen
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

6. AA E-1431  **96** **Mikrotiterplatte beschichtet mit Kaninchenantikörper gegen freies Testosteron - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.
 Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

7. AA E-1840 CONJUGATE-CONC 50x **Freies Testosteron-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat-Konzentrat**
– benötigt eine Vorbereitung **x50**

- Inhalt:** Freies Testosteron-HRP-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen:** 300 µl/Fläschchen
- Lagerung:** Gekühlt bei 2 - 8 °C
- Stabilität:** 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Vorbereitung:** Vor der Verwendung 1:50 mit Assay-Puffer verdünnen (z. B. 40 µl HRP mit 2 ml Assay-Puffer). Wenn die ganze Platte verwendet werden soll, 240 µl HRP mit 12 ml Assay-Puffer verdünnen. Was übrigbleibt, ist zu entsorgen.

TESTVERFAHREN

<p>Probenvorbehandlung: Keine.</p>
<p>Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.</p>
<p>1. Stellen Sie Arbeitslösungen von Testosteron-HRP-Konjugat und Waschpuffer her.</p>
<p>2. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.</p>
<p>3. Pipettieren Sie 25 µl jeder Standard, Kontrolle und Probe jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells.</p>
<p>4. Pipettieren Sie jeweils 100 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jeden Well. <i>(Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.)</i></p>
<p>5. Schütteln Sie die Platte 10 Sekunden lang vorsichtig.</p>
<p>6. 1 Stunde Inkubation der Platte bei 37 °C</p>
<p>7. Waschen Sie die Wells 3x mit 350 µl verdünnten Waschpuffers pro Well und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist (<i>Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen</i>).</p>
<p>8. Pipettieren Sie jeweils 150 µl TMB-Substrat in definierten Zeitintervallen in die Wells.</p>
<p>9. 10 - 15 Minuten Inkubation der Platte bei 37 °C <i>(oder bis die dunkelblaue Farbe des Standard A den gewünschten OD erreicht).</i></p>
<p>10. Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 8 je 50 µl Stopplösung in jeden Well pipettieren.</p>
<p>11. Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.</p>
<p> <i>Wenn die OD die obere Messgrenze überschreitet oder kein 450-nm-Filter verfügbar ist, kann ersatzweise ein 405- oder 415-nm-Filter eingesetzt werden. Die optischen Dichten sind damit niedriger, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben.</i></p>

BERECHNUNGEN

- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
- Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittleren optischen Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
- Lesen Sie die unbekanntes Werte direkt von der Standardkurve ab.

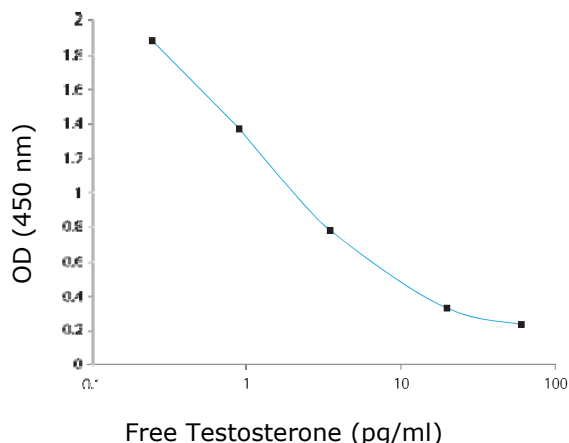
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.

Standard	Mittelwert OD (450 nm)	Wert (pg/ml)
A	2,292	0
B	1,680	0,1
C	1,181	1
D	0,780	5
E	0,426	20
F	0,214	60
Unbekannt	1,066	1,59
Unbekannt	0,441	19,6

TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde aus 64 Bestimmungen aus einer niedrig konzentrierten Probe und dem LoB ermittelt.

$LoD = LoB + 1,645\sigma S$

Wobei σS die Standardabweichung von der niedrig konzentrierten Probe ist. Die Standardabweichung ist 0,0093, gemessen an 64 Bestimmungen einer niedrig konzentrierten Probe.

$LoD = 0,0025 + (1,645 * 0,0093) = \mathbf{0,018 \text{ pg/ml}}$

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* Kit auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Testosteron war.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Testosterone	100
5 α -DHT	3.5
Androstenedione	0.17
Progesterone	0.007
Androsterone	0.075
Aldosterone	<0.008
Cholesterol	<0.0001
Cortisone	0.0025
DHEA	0.071
DHEAS	0.0014
17 β -Estradiol	0.15
Estriol	<0.008
Pregnenolone	0.028

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Fünf Proben wurden jeweils 24-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	VK %
1	2,24	6,7
2	3,81	6,4
3	13,6	6,0
4	13,7	5,9
5	23,7	4,8

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden 20 Mal in Doppelbestimmung über einen Zeitraum von mehr als 10 Tagen untersucht worden. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	VK %
1	3,53	8,1
2	13,8	11,5
3	23,3	6,9

VERGLEICHSTUDIEN

Das *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* Kit (y) wurde mit einem auf beschichteten Röhrchen basierenden RIA-Kit zur Messung freien Testosterons eines Konkurrenten (x) verglichen. Der Vergleich von 60 Serumproben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse:

$$y = 0,9362x \text{ (Konkurrenz)} + 3,8794$$

$$r = 0,97$$

EINFLUSS VON SEXUALHORMON-BINDENDEN GLOBULIN (SHBG)

Das Ziel dieser Studie war es, eine mögliche Störung durch Bindung von SHBG an freies Testosteron-Meerrettichperoxidase-Konjugat zu untersuchen. Ein mit Aktivkohle gestrippter Humanserum-Pool wurde mit genau definierten SHBG-Konzentrationen im Bereich von 6,25 bis 200 µg/ml dotiert und mit dem *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* gemessen. Ergebnisse (in pg/ml):

Zugegebenes SHBG	OD 450 nm	Prozent B/B ₀ (%)
0	2,37	100,0
6,25	2,37	99,9
12,5	2,34	98,7
50	2,36	99,5
200	2,27	95,6

Die Ergebnisse zeigten Bindungswerte zwischen 95 - 100% B/B₀ (B₀ = undotiertes Serum) auch bei höheren als normalen SHBG-Spiegeln. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es bei dem *Free Testosterone ELISA 2nd Generation* keinen signifikanten Einfluss von SHBG gibt.

ERWARTETE STANDARDWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen. Die Ergebnisse einer Studie bei gesund erscheinenden Probanden ergaben die folgenden Ergebnisse (alle Werte sind in pg/ml angegeben):







Geschlecht / Alter	N	95% Vertrauensbereich	Absoluter Bereich
Männer / < 13	44	-	ND - 1,6
Männer / 13 - 19	37	-	ND - 22,3
Männer / 20 - 39	120	9,1 - 32,2	-
Männer / 40 - 59	120	5,7 - 30,7	-
Männer / ≥ 60	120	5,9 - 27,0	-
Frauen / < 13	63	-	ND - 1,3
Frauen / 13 - 19	17	-	0,2 - 2,0
Frauen / 20 - 39	120	0,1 - 6,3	-
Frauen / 40 - 59	120	0,2 - 4,1	-
Frauen / ≥ 60	60	0,5 - 3,9	-

LITERATUR

1. Winter SJ, et al. The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. *Clin Chem.* 1998; 44(10):2178-82.
2. Ooi DS, et al. Establishing Reference Interval for DPC's Free Testosterone Radioimmunoassay. *Clin Biochem.* 1998; 31(1):15-21.
3. Marcus GJ, Dumford R. A Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Testosterone. *Steroids.* 1985; 46:975-86.
4. Joshi UM, et al. A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. *Steroids.* 1979; 34(1):35-46.
5. Swinkels LM, et al. Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. *Am Clin Biochem.* 1988; 25(Pt 4):354-9.
6. Swinkels LM, et al. A Symetric Dialysis Method for the Determination of Free Testosterone in Human Plasma. *Clin Chem Acta.* 1987; 165(2-3):341-9.
7. Ekins R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1990; 27(Pt 1):91-4.
8. Manni A, et al. Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(4):705-10.
9. Ekins R. The Science of Free Testosterone Measurement. *Proc UK NEQAS Meeting.* 1998; 3:35-9.
10. Longcope C, et al. Free Estradiol, Free Testosterone, and Sex Hormone-Binding Globulin in Perimenopausal Women. *J Clin Endo Metab.* 1987; 64(3):513-8.
11. Vermeulen A, et al. The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. *J Clin Endo Metab.* 1971; 33(5):759-67.
12. Paulson JD, et al. Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. *Am J Obs Gynecol.* 1977; 128(8):851-7.
13. Cumming DC, Wall SR. Non-Sex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J Clin Endo Metab.* 1985; 61(5):873-6.
14. Baxendale PM, et al. Salivary Testosterone: Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hyperandrogenic Women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1982; 16(6):595-603.
15. Biffignandi P, et al. Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. *Endocrinol Rev.* 1984; 5(4):498-513.
16. Wu CH. Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. *Obstet Gynecol.* 1982; 60(2):188-94.
17. Bamman BL, et al. Total and Free Testosterone During Pregnancy. *Am J Obsetet Gynecol.* 1980; 137(3):293-8.
18. Halpern EP, et al. Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. *Clin Chem.* 1980; 26:68.
19. Wheeler MJ. The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1995; 32(Pt 4):345-57.
20. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139-40.

Please use only the valid version of the instruction for use provided with the kit.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		