



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use
Free Testosterone ELISA

REF

AA E-1400



IVD



Free Testosterone ELISA

English

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Free Testosterone by 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 unlabeled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. 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 kit utilizes a highly specific rabbit anti-testosterone polyclonal antibody at a low binding capacity ($K_{eq} \times \text{concentration}$) 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, however in women 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 microwells 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 100 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 controls 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. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a 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

- Precision pipettes to dispense 25, 50, 100, 150 and 300 µl
- Disposable pipette tips
- Distilled or deionized water
- A 37 °C incubator
- Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 11).

REAGENTS PROVIDED

AA E-0030 **WASH-CONC** **10x** **Wash Buffer Concentrate – 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.

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.

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

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

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-1401	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	0.5 ml
AA E-1402	STANDARD B	Standard B	0.1 pg/ml	0.5 ml
AA E-1403	STANDARD C	Standard C	1 pg/ml	0.5 ml
AA E-1404	STANDARD D	Standard D	5 pg/ml	0.5 ml
AA E-1405	STANDARD E	Standard E	20 pg/ml	0.5 ml
AA E-1406	STANDARD F	Standard F	60 pg/ml	0.5 ml
AA E-1451	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
AA E-1452	CONTROL 2	Control 2		0.5 ml

Contents: 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°C

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

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

Contents: One bottle containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

AA E-1431 96 **Rabbit Anti-Free Testosterone Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.**

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

AA E-1440 CONJUGATE-CONC 50x **Free Testosterone-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate - 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 microwell 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 microwell plate 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

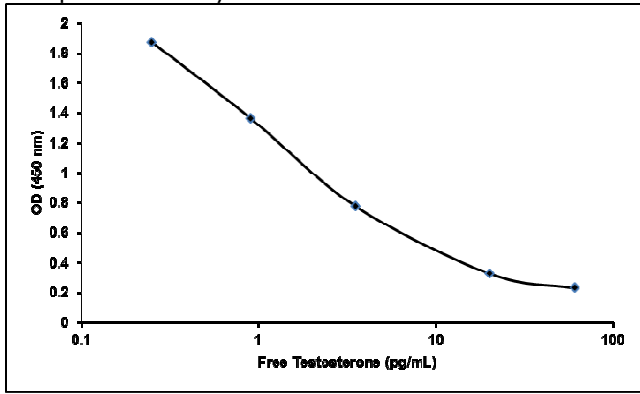
1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate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

TYPICAL TABULATED DATA:

Standard	Mean OD (450nm)	Value (pg/ml)
A	2.615	0
B	1.871	0.25
C	1.362	0.9
D	0.775	3.5
E	0.325	20
F	0.230	60
Unknown	0.974	2.11
Unknown	0.378	16.16

TYPICAL STANDARD CURVE

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



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the Direct Free Testosterone ELISA kit is **0.17 pg/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

Steroid	%Cross Reactivity
Testosterone	100
5α-DHT	5.2
Androstenedione	1.4
Androstenediol	0.8
Progesterone	0.5
Androsterone	0.1

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.1%: Aldosterone, Andrenosterone, Cholesterol, Corticosterone, Dehydroepiandrosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate, Epiandrosterone, 17β-Estradiol, Estriol and Pregnenolone.

INTRA-ASSAY PRECISION

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

Sample	Mean	SD	CV%
1	1.17	0.20	17.0
2	15.96	0.79	4.9
3	62.46	2.95	4.7

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of two weeks. The results (in pg/ml) are tabulated below:

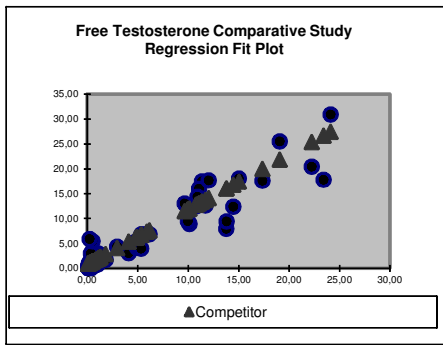
Sample	Mean	SD	CV%
1	0.97	0.12	12.4
2	25.81	1.36	5.3
3	75.81	6.66	8.8

COMPARATIVE STUDIES

The Direct Free Testosterone ELISA Kit (y) was compared with a competitors Free Testosterone Coated Tube RIA Kit (x). The comparison of 61 serum samples yielded the following linear regression results:

$$y = 1.0137x \text{ (competitor)} + 0.6404$$

$$r = 0.89$$



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):

Group	N	Median	Central 95% Range	Absolute Range
Males	71	12.3	4.25-30.37	3.84-34.17
Females	60	1.03	0.04-4.18	0.01-7.01

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-horse radish peroxidase conjugate. A charcoal-stripped human serum pool was spiked precisely with SHBG at concentrations ranging from 6-200 µg/ml and was assayed with the Direct Free Testosterone ELISA Kit. Results tabulated below (in pg/ml):

SHBG Added	OD 450nm	Percent B/B ₀ (%)
0 µg/ml	2.34	100.0
6.25 µg/ml	2.33	99.7
12.5 µg/ml	2.27	97.2
50 µg/ml	2.14	91.6
200 µg/ml	2.10	89.7

The results showed bound values between 90-100% of B/B₀ (B₀=unspiked serum) even at higher than normal (0.5-5 µg/ml) SHBG levels. In conclusion, the results showed that there was no significant influence by SHBG in the Direct Free Testosterone Direct ELISA kit.

EFFECT OF HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)

The purpose of this study was to investigate a possible interference of human serum albumin (HSA) on the assay procedure. HSA was added to three patient samples at concentrations of 1.25, 2.5 and 5.0 g/dl. All samples were assayed with the Direct Free Testosterone ELISA Kit and yielded the following results (in pg/ml):

Sample	Added HSA g/dl			
	0	1.25	2.5	5.0
1	0.52	0.34	0.54	0.53
2	15.8	14.2	12.5	10.9
3	26.2	23.0	21.0	18.6







The results demonstrate no significant influence of added HSA on the three patient serum samples.

REFERENCES

- Winter, S.J., et al., The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. Clin. Chem. 44 (10):2178-2182, 1998.
- Ooi, D.S., et al., Establishing Reference Interval for DPC's Free Testosterone Radioimmunoassay. Clin. Biochem. 31(1):15-21, 1998.
- Marcus, G.J., et al., A Simple Linked Immunoassay for Testosterone. Steroids 46:975, 1985.
- Joshi, U.M., et al., A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. Steroids 34:35, 1979.
- Swinkels, L.M. J. et al., Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. Am. Clin. Biochem. 25:354, 1988.

- Swinkels, L.M.J., et al., A Symetric Dialysis Method for the Determination of Free Testosterone in Human Serum. Clin. Chem. Acta 165:341, 1987.
- Ekins, R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. Ann. Clin. Biochem 27:91,1990.
- Manni, A., et al., Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. J. Clin. Endo. Metab. 61:705, 1985.
- Ekins, R. The Science of Free Testosterone Measurement. Proc.UK NEQAS Meeting. 3:35-39, 1998.
- Longcope, C, et al., Free Estradiol, Free Testosterone and Sex Hormone Binding Globulin in Perimenopausal Women. J. Clin. Endo. Metab. 64:513, 1987.
- Vermeulen, A., et al., The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. J. Clin. Endo. Metab. 33:759, 1971.
- Paulson, J.D., et al., Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. Am. J. Obs. Gyneco. 128:851, 1977.
- Cumming D.C., et al., Non Sex Hormone Binding Globulin Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. J. Clin. Endo. Metab. 61:873, 1985.
- Baxendale, P.M., et al., Salivary Testosterone Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hypeandrogenic Women. Clin. Endocrinol. 16:595, 1982.
- Biffignandi, P., et al., Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. Endocrinol Rev. 5:488, 1984.
- Wu, C.H., Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. Obstet. Gynecol. 60:188, 1982.
- Bamman B.L., et al., Total and Free Testosterone During Pregnancy. Am. J. Obsetet. Gynecol. 137:293:1980.
- Halpern, E.P. et al., Production of Anti-Testosterone Antiseren in Rabbits. Clin. Chem. 26:68, 1980.
- Wheeler, M.J., The Determination of Bio-Available Testosterone. Ann. Clin. Biochem. 32:345, 1995.
- Check, J.H., et al, Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol. Obstet. Invest. 40:139-140, 1995.

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	RUO	For research use only!

VERWENDUNGSZWECK

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

Deutsch

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entsteht 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 C_{19} -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 Serumpools 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 100 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; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

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

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

AA E-0030 WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat - 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.

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.

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

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-1401	<u>STANDARD</u> A	Standard A	0 pg/ml	0,5 ml
AA E-1402	<u>STANDARD</u> B	Standard B	0,1 pg/ml	0,5 ml
AA E-1403	<u>STANDARD</u> C	Standard C	1 pg/ml	0,5 ml
AA E-1404	<u>STANDARD</u> D	Standard D	5 pg/ml	0,5 ml
AA E-1405	<u>STANDARD</u> E	Standard E	20 pg/ml	0,5 ml
AA E-1406	<u>STANDARD</u> F	Standard F	60 pg/ml	0,5 ml
AA E-1451	<u>CONTROL</u> 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,5 ml
AA E-1452	<u>CONTROL</u> 2	Kontrolle 2		0,5 ml

Inhalt: 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.

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

AA E-1431 - IT 96 **Mikrotiterplatte beschichtet mit Kaninchenantikörper gegen freies Testosteron - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.
 Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8), 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.

AA E-1440

CONJUGATE-CONC 50x


**Freies Testosteron-Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat-Konzentrat
– 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

Probenvorbehandlung: Keine.

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.

1. Stellen Sie Arbeitslösungen von Testosteron-HRP-Konjugat und Waschpuffer her.
2. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
3. Pipettieren Sie 25 µl jeder Standard, Kontrolle und Probe jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells.
4. Pipettieren Sie jeweils 100 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jeden Well. <i>(Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.)</i>
5. Schütteln Sie die Platte 10 Sekunden lang vorsichtig.
6. 1 Stunde Inkubation der Platte bei 37 °C
7. Waschen Sie die Wells 3× 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>).
8. Pipettieren Sie jeweils 150 µl TMB-Substrat in definierten Zeitintervallen in die Wells.
9. 10–15 Minuten Inkubation der Platte bei 37 °C <i>(oder bis Standard A dunkelblaue Farbe für gewünschte OD erreicht).</i>
10. Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 8 je 50 µl Stopplösung in jeden Well pipettieren.
11. Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
 <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>

BERECHNUNGEN

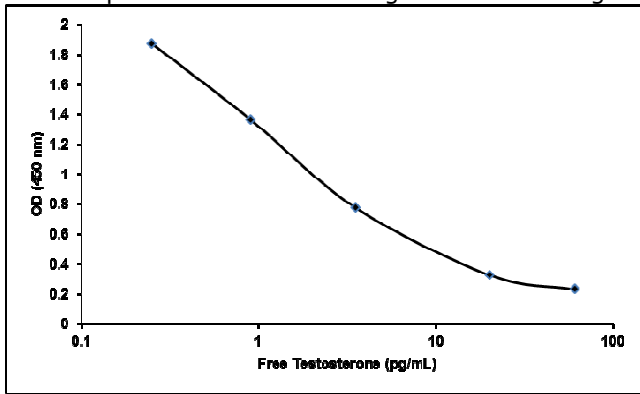
1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
2. Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.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

TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Standard	MW OD	Wert (pg/ml)
A	2,615	0
B	1,871	0,25
C	1,362	0,9
D	0,775	3,5
E	0,325	20
F	0,230	60
Unbekannt	0,974	2,11
Unbekannt	0,378	16,16

TYPISCHE STANDARDKURVE

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



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der Standardkurve durch die Bestimmung der resultierenden Konzentration der mittleren OD der Standard A (basierend auf 10 Analysen) minus 2σ. Daher beträgt die Empfindlichkeit des "Direct Free Testosterone ELISA Kit" **0,17 pg/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem "Direct Free Testosterone ELISA Kit" auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Testosteron war.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Testosteron	100
5α-DHT	5,2
Androstendion	1,4
Androstandiol	0,8
Progesteron	0,5
Androsteron	0,1

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,1% Kreuzreaktivität: Aldosteron, Andrenosteron, Cholesterin, Corticosteron, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, Epiandrosteron, 17β-Östradiol, Östriol und Pregnenolon.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Drei Proben wurden jeweils 10-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	1,17	0,20	17,0
2	15,96	0,79	4,9
3	62,46	2,95	4,7

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

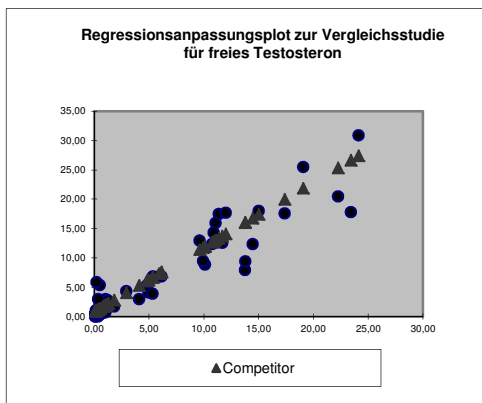
Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	0,97	0,12	12,4
2	25,81	1,36	5,3
3	75,81	6,66	8,8

VERGLEICHSTUDIEN

Das "Direct Free Testosterone ELISA Kit" (y) wurde mit einem auf beschichteten Röhrchen basierenden RIA-Kit zur Messung freien Testosterons eines Konkurrenten (x) verglichen. Der Vergleich von 61 Serumproben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse:

$$y = 1.0137 x (\text{Konkurrenz}) + 0,6404$$

$$r = 0,89$$



ERWARTETE STANDARDWERTE

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

Gruppe	N	Median	Mittlere 95%	Absoluter Bereich
♂	71	12,3	4,25-30,37	3,84-34,17
♀	60	1,03	0,04-4,18	0,01-7,01

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 bis 200 µg/ml dotiert und mit dem "Direct Free Testosterone ELISA" gemessen. Ergebnisse unten tabellarisch (in pg/ml):

Zugegebenes SHBG	OD 450 nm	Prozent B/B ₀ (%)
0 µg/ml	2,34	100,0
6,25 µg/ml	2,33	99,7
12,5 µg/ml	2,27	97,2
50 µg/ml	2,14	91,6
200 µg/ml	2,10	89,7

Die Ergebnisse zeigten Bindungswerte zwischen 90–100% B/B₀ (B₀ = undotiertes Serum) auch bei höheren als normalen (0,5–5 µg/ml) SHBG-Spiegeln. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es bei dem "Direct Free Testosterone Direct ELISA" keinen signifikanten Einfluss von SHBG gibt.

Wirkung von humanem Serumalbumin (HSA)

Der Zweck dieser Studie war es, eine mögliche Störwirkung von Humanserumalbumin (HSA) auf das Messverfahren zu untersuchen. HSA wurde drei Patientenproben in Konzentrationen von 1,25; 2,5 und 5,0 g/dl

zugegeben. Alle Proben wurden mit dem "Direct Free Testosterone ELISA" getestet und ergaben die folgenden Messwerte (in pg/ml):







Probe	Hinzugefügtes HSA g/dl			
	0	1.25	2.5	5.0
1	0,52	0,34	0,54	0,53
2	15,8	14,2	12,5	10,9
3	26,2	23,0	21,0	18,6

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluss zugegebenen HSAs auf die drei Patientenserumproben.

LITERATUR

- Winter, S.J., et al., The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. Clin. Chem. 44 (10):2178-2182, 1998.
- Ooi, D.S., et al., Establishing Reference Interval for DPC's Free Testosterone Radioimmunoassay. Clin. Biochem. 31(1):15-21,1998.
- Marcus, G.J., et al., A Simple Linked Immunoassay for Testosterone. Steroids 46:975, 1985.
- Joshi, U.M., et al., A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. Steroids 34:35, 1979.
- Swinkels, L.M. J. et al., Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. Am. Clin. Biochem. 25:354, 1988.
- Swinkels, L.M.J., et al., A Symetric Dialysis Method for the Determination of Free Testosterone in Human Serum. Clin. Chem. Acta 165:341, 1987.
- Ekins, R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. Ann. Clin. Biochem 27:91,1990.
- Manni, A., et al., Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. J. Clin. Endo. Metab. 61:705, 1985.
- Ekins, R. The Science of Free Testosterone Measurement. Proc.UK NEQAS Meeting. 3:35-39, 1998.
- Longcope, C, et al., Free Estradiol, Free Testosterone and Sex Hormone Binding Globulin in Perimenopausal Women. J. Clin. Endo. Metab. 64:513, 1987.
- Vermeulen, A., et al., The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. J. Clin. Endo. Metab. 33:759, 1971.
- Paulson, J.D., et al., Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. Am. J. Obs. Gyneco. 128:851, 1977.
- Cumming D.C., et al., Non Sex Hormone Binding Globulin Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. J. Clin. Endo. Metab. 61:873, 1985.
- Baxendale, P.M., et al., Salivary Testosterone Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hypeandrogenic Women. Clin. Endocrinol. 16:595, 1982.
- Biffignandi, P., et al., Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. Endocrinol Rev. 5:488, 1984.
- Wu, C.H., Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. Obstet. Gynecol. 60:188, 1982.
- Bamman B.L., et al., Total and Free Testosterone During Pregnancy. Am. J. Obsetet. Gynecol. 137:293:1980.
- Halpern, E.P. et al., Production of Anti-Testosterone Antiseren in Rabbits. Clin. Chem. 26:68, 1980.
- Wheeler, M.J., The Determination of Bio-Available Testosterone. Ann. Clin. Biochem. 32:345, 1995.
- Check, J.H., et al, Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol. Obstet. Invest. 40:139-140, 1995.

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	RUO	Nur für Forschungszwecke