

# Free Testosterone Elisa

*KAPDB260*





# History

---

## Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
150325/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <a href="https://www.diasource-diagnostics.com/">https://www.diasource-diagnostics.com/</a> "
No IVD symbol	IVD symbol added
<b>LOT</b> : 180404/1	Version: 200224/1
PI number : 1701239	No PI number
No manufacturer symbol	Manufacturer symbol added



# Free Testosterone Elisa

en

For the direct quantitative determination of Free Testosterone by enzyme immunoassay in human serum.

## KAPDB260 IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

### 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 calibrators, 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 calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of free testosterone in patient samples and controls can be directly read.

The DIAsource free testosterone kit utilizes a highly specific rabbit anti-testosterone polyclonal antibody at a low binding capacity (Keq x 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 calibration 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, calibrator 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 calibrators 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.

### SERUM 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. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater.

## REAGENTS PROVIDED

### **ULI** 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.

### Ag HRP CONC **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.

### CAL N **Free Testosterone Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5**

Contents: six 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.  
\*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume
Calibrator 0	0 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 1	0.1 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 2	1 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 3	5 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 4	20 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 5	60 pg/ml	0.5 ml

Storage: Refrigerate at 2-8°C  
Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

### CONTROL N **Controls - Ready To Use. N = 2**

Contents: Two vials containing testosterone in a human serum-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with precise quantities of testosterone. Refer to vial labels for the acceptable range.  
Volume: 0.5 ml/vial  
Storage: Refrigerate at 2-8 °C  
Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

### WASH SOLN CONC **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.

### ASS BUF **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.

### CHROM TMB **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.

### 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.

## ASSAY PROCEDURE

### Specimen Pretreatment:

None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, 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 calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
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 (the use of a washer is recommended).
8. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
9. Incubate the plate at 37°C for 10-15 minutes (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
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.

\* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

## CALCULATIONS

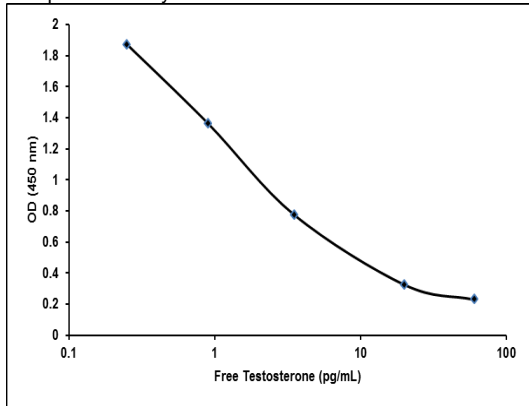
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3.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

## TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	Mean OD (450nm)	Value (pg/ml)
0	2.292	0
1	1.680	0.1
2	1.181	1
3	0.780	5
4	0.426	20
5	0.214	60
Unknown	1.066	1.59
Unknown	0.441	19.6

## TYPICAL CALIBRATION 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 + 1.645σS,

where σS is the standard deviation of the low value sample.

σS was determined to be 0.0093 based on 64 measurements of a low value sample.

LoD = 0.0025 + (1.645 \* 0.0093) = 0.018 pg/mL.

### COMPARATIVE STUDIES

The DAsource Free Testosterone ELISA Kit (y) was compared with a competitor's Free Testosterone Coated Tube RIA Kit (x). The comparison of 60 serum samples yielded the following linear regression results:

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

### SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

Steroid	%Cross Reactivity
Testosterone	100
5α-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
17β-Estradiol	0.15
Estriol	<0.008
Pregnenolone	0.028

### INTRA-ASSAY PRECISION

Five samples were assayed 24 times each on the same calibration 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

## 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 DAsource Free Testosterone ELISA Kit. Results tabulated below (in pg/ml):

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

The results showed % bounding values between 95-100% (B<sub>0</sub>=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

- 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 Hyperandrogenic Women. Clin. Endocrinol. 16:595, 1982.
- Biffignandi, P., et al., Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutic 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. Obstet. Gynecol. 137:293:1980.
- Halpern, E.P. et al., Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. Clin. Chem. 26:68, 1980.
- Wheeler, M.J., The Determination of Bio-Available Testosterone. Ann. Clin. Biochem. 32:345, 1995.

21. 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.

Revision date : 2020-02-24

**Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>**



## KAPDB260 DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique - Tél. : +32 10 84 99 11 - Téléc. : +32 10 84 99 90

### BUT DU DOSAGE :

Pour la détermination quantitative directe de la testostérone libre par dosage immunoenzymatique dans le sérum humain.

A usage de diagnostic *in vitro* exclusivement.

### PRINCIPE DU TEST

Le principe du dosage immunoenzymatique suit le scénario typique de la liaison compétitive. La compétition se produit entre un antigène non-marqué (présent dans les calibrateurs, les contrôles et les échantillons) et un antigène à marquage enzymatique (conjugué) pour un nombre limité de sites de liaison sur la microplaque. Les méthodes de lavage et de décantation éliminent les substances non liées. Après l'étape de lavage, le substrat enzymatique est ajouté. La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt. L'absorbance est mesurée sur un lecteur de microplaque. L'intensité de la couleur formée est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone libre dans l'échantillon. Un jeu de calibrateurs est utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage à partir de laquelle il est possible de lire directement la quantité de testostérone libre dans les échantillons et contrôles.

La trousse Free Testostérone de DIAsource utilise un anticorps polyclonal anti-testostérone de lapin hautement spécifique à faible capacité de liaison (K<sub>eq</sub> x concentration) pour réduire au maximum les perturbations de l'équilibre testostérone-protéine. Les autres composants du système sont également optimisés afin de ne pas modifier la concentration originale en testostérone libre.

### APPLICATIONS CLINIQUES

La testostérone est un stéroïde de type C-19 sécrété par les testicules et le cortex surrénal chez les hommes et par le cortex surrénal et les ovaires chez les femmes. La testostérone est également produite par les tissus périphériques à partir de l'androstènedione, qui est physiologiquement peu important chez les hommes; toutefois chez les femmes, près de la moitié de la testostérone circulante dérive de cette source. Les mesures de la testostérone servent principalement à l'évaluation de l'hypogonadisme chez les hommes et des états hyperandrogéniques chez les femmes.

La testostérone circule dans le sang, liée à trois protéines : la globuline liée aux hormones sexuelles (60 à 80 %), l'albumine et la globuline liée au cortisol. Seuls 1 à 2 % de la testostérone circulante totale reste non liée ou libre. Même si elle continue de faire l'objet de recherches, la plupart des chercheurs acceptent la détermination de la testostérone libre comme mesure de la fraction biologiquement active. Les déterminations de la testostérone libre sont recommandées pour surmonter les influences causées par les variations des protéines de transport sur la concentration totale de testostérone.

### MISES EN GARDE ET AVERTISSEMENTS METHODOLOGIQUES

1. Les utilisateurs doivent avoir une compréhension approfondie de ce protocole pour utiliser cette trousse avec succès. Une performance fiable ne sera atteinte que par l'observation stricte et attentive des instructions fournies.
2. Les contrôles et les pools de sérum à haut et faible taux doivent être inclus dans chaque essai afin d'évaluer la fiabilité des résultats.
3. Lorsque l'utilisation d'eau est précisée pour la dilution ou la reconstitution, celle-ci doit être désionisée ou distillée.
4. Afin de réduire l'exposition à des substances potentiellement nocives, le technicien doit porter des gants lors de la manipulation des réactifs et des échantillons humains de la trousse.
5. Tous les réactifs et échantillons de la trousse doivent atteindre une température ambiante et être mélangés délicatement et soigneusement avant usage. Éviter de congeler et de décongeler de manière répétée les réactifs et échantillons.
6. Une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque série.
7. Les contrôles doivent être inclus dans chaque série et tomber dans les limites de confiance établies.
8. Des techniques méthodologiques incorrectes, un pipetage imprécis, un lavage incomplet de même que la conservation inadéquate du réactif

peuvent être indiqués lorsque les valeurs pour les contrôles ne reflètent pas les plages établies.

9. Lors de la lecture de la microplaque, la présence de bulles dans les micropuits compromettra les densités optiques (DO). Éliminer avec soin toute bulle avant de passer à l'étape de lecture.

10. La solution de substrat (TMB) est sensible à la lumière et doit rester incolore si elle a été conservée de manière appropriée. L'instabilité ou la contamination de la solution peut être indiquée par la formation d'une couleur bleue, auquel cas, la solution ne doit pas être utilisée.

11. Lors de la distribution du substrat et de la solution d'arrêt, ne pas utiliser de pipettes dans lesquelles ces liquides entreraient en contact avec des pièces métalliques.

12. Afin de prévenir la contamination des réactifs, utiliser un embout de pipette jetable neuf pour la distribution de chaque réactif, échantillon, calibrateur et contrôle.

13. Ne pas mélanger différents numéros de lot de composants de la trousse dans un même essai et ne pas utiliser de composant au-delà de sa date de péremption imprimée sur l'étiquette.

14. Les réactifs de la trousse doivent être considérés comme des déchets dangereux et mis au rebut conformément aux réglementations nationales en vigueur.

### LIMITES

1. Tous les réactifs de la trousse sont étalonnés pour la détermination directe de la testostérone libre dans le sérum humain. Cette trousse n'est pas étalonnée pour la détermination de la testostérone libre dans d'autres échantillons d'origine humaine ou animale.
2. Ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques et icteriques ou conservés de manière inadéquate.
3. Tous les échantillons ou sérums de contrôle contenant de l'azide ou du thimérosal ne sont pas compatibles avec cette trousse, car ils peuvent produire de faux résultats.
4. Les échantillons supérieurs à 60 pg/ml ne doivent pas être dilués. La dilution modifiera l'équilibre entre la testostérone et les protéines sériques.
5. Les résultats obtenus avec cette trousse ne doivent jamais servir de base unique à l'établissement d'un diagnostic clinique. Par exemple, l'occurrence d'anticorps hétérophiles chez des patients régulièrement exposés à des animaux ou à des produits animaux peut potentiellement causer des interférences dans les essais immunologiques. En conséquence, le diagnostic clinique doit inclure tous les aspects des antécédents du patient, incluant la fréquence d'exposition à des animaux/produits animaux lorsqu'on soupçonne que de faux résultats ont été produits.

### MISES EN GARDE ET AVERTISSEMENTS DE SÉCURITÉ SUBSTANCE POTENTIELLEMENT INFECTIEUSE

Le sérum humain qui peut être utilisé dans la préparation des calibrateurs et des contrôles a été testé et déclaré non réactif à l'antigène de surface de l'hépatite B; il a également été testé pour la présence d'anticorps au VHC et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et déclaré négatif. Toutefois, aucune méthode d'essai ne peut offrir une assurance absolue concernant l'absence du VIH, VHC et VHB ou de tout autre agent infectieux dans les réactifs. Les réactifs doivent donc être considérés comme un danger biologique potentiel et manipulés en prenant les mêmes précautions qu'avec tout échantillon de sang.

### DANGERS CHIMIQUES

Éviter tout contact avec les réactifs contenant du TMB, du peroxyde d'hydrogène et de l'acide sulfurique. En cas de contact avec l'un de ces réactifs, laver la partie affectée avec beaucoup d'eau. Le TMB est suspecté d'être un agent cancérogène.



## PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Environ 0,1 ml de sérum est nécessaire pour une détermination en double. Prélever 4 à 5 ml de sang dans une éprouvette étiquetée de manière appropriée et permettre au sang de coaguler. Centrifuger et enlever avec soin la couche de sérum. Conserver à 4 °C jusqu'à 24 heures ou à -10 °C ou une température inférieure si les analyses seront effectuées à une date ultérieure. Considérer tous les échantillons humains comme étant des substances possiblement infectieuses et prendre les mesures de précaution appropriées lors de leur manipulation.

## PRÉTRAITEMENT DU SÉRUM

Cet essai est un système direct; aucun prétraitement des échantillons n'est requis.

## RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES, MAIS NON-FOURNIS

1. Pipettes de précision pour distribuer 25, 50, 100, 150 et 350 µl
2. Embouts de pipette jetables
3. Eau distillée ou désionisée
4. Incubateur à 37 °C
5. Lecteur de microplaque avec jeu de filtres à 450 nm et une limite de DO supérieure à 3,0 ou plus

## RÉACTIFS FOURNIS

### **ULI** Microplaque recouverte d'anticorps anti-testostérone libre de lapin - Se détache facilement - Prête à l'emploi

Contenu : Une microplaque de 96 puits (12 x 8) recouverte d'un anticorps polyclonal dans une pochette refermable avec dessiccant.  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.

### **AG HRP CONC** Testostérone libre- Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugué concentré – X50

Contenu : Conjugué de testostérone libre-HRP dans une substance tampon à base de protéine avec un agent de conservation sans mercure.  
Volume : 300 µl/flacon  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.  
Préparation : Diluer dans la solution tampon d'essai dans un rapport de 1:50 avant usage (p. ex. 40 µl de HRP dans 2 ml de solution tampon d'essai). Si la plaque entière sera utilisée, diluer 240 µl de HRP dans 12 ml de tampon d'essai. Jeter toute solution qui reste.

### **CAL N** Calibrateurs de testostérone libre - Prêts à l'emploi. N = 0 à 5

Contenu : Six flacons contenant de la testostérone dans un tampon à base de sérum humain avec un agent de conservation sans mercure. Préparés en surchargeant le sérum avec une quantité précise de testostérone équivalant à environ 0, 0,1, 1, 5, 20 et 60 pg/ml de testostérone libre.  
\*Les concentrations indiquées ci-dessous sont approximatives, se reporter aux étiquettes des flacons pour les concentrations exactes.

Calibrateur	Concentration	Volume
Calibrateur 0	0 pg/ml	0,5 ml
Calibrateur 1	0,1 pg/ml	0,5 ml
Calibrateur 2	1 pg/ml	0,5 ml
Calibrateur 3	5 pg/ml	0,5 ml
Calibrateur 4	20 pg/ml	0,5 ml
Calibrateur 5	60 pg/ml	0,5 ml

Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois pour les flacons non ouverts ou comme indiqué sur l'étiquette. Une fois ouverts, les calibrateurs doivent être utilisés dans les 14 jours qui suivent ou séparés en aliquotes et conservés surgelés. Éviter les cycles multiples de congélation et décongélation.

### **CONTROL** Contrôles - Prêts à l'emploi. N = 2

Contenu : Deux flacons contenant de la testostérone dans un tampon à base de sérum humain avec un agent de conservation sans mercure. Préparés en surchargeant le sérum avec des quantités précises de testostérone. Se reporter aux étiquettes des flacons pour la plage acceptable.  
Volume : 0,5 ml/flacon  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois pour un flacon non ouvert ou comme indiqué sur l'étiquette. Une fois ouverts, les contrôles doivent être utilisés dans les 14 jours qui suivent ou séparés en aliquotes et conservés surgelés. Éviter les cycles multiples de congélation et décongélation.

### **WASH SOLN CONC** Tampon de lavage concentré - X10

Contenu : Une bouteille contenant un tampon avec un détergent non ionique et un agent de conservation sans mercure.  
Volume : 50 ml/bouteille  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.  
Préparation : Diluer dans de l'eau distillée ou désionisée dans un rapport de 1:10 avant usage. Si la plaque entière sera utilisée, diluer 50 ml de tampon de lavage concentré dans 450 ml d'eau.

### **ASS BUF** Tampon d'essai - Prêt à l'emploi.

Contenu : Une bouteille contenant un tampon à base de protéine avec un agent de conservation sans mercure.  
Volume : 15 ml/bouteille  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.

### **CHROM TMB** Substrat de TMB- Prêt à l'emploi.

Contenu : Une bouteille contenant du tétraméthylbenzidine et du peroxyde d'hydrogène dans un tampon sans N,N-diméthylformamide (non-DMF) ou diméthylsulfoxyde (DMSO).  
Volume : 16 ml/bouteille  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.

### **STOP SOLN** Solution d'arrêt- Prête à l'emploi.

Contenu : Un flacon contenant 1 M d'acide sulfurique.  
Volume : 6 ml/bouteille  
Conservation : Réfrigérer entre 2 et 8 °C  
Stabilité : 12 mois ou comme indiqué sur l'étiquette.

## MODE OPERATOIRE

### Prétraitement des échantillons : *Aucun*

Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante avant usage. Les calibrateurs, contrôles et échantillons doivent être testés en double. Une fois que la méthode a été entreprise, toutes les étapes doivent être effectuées sans interruption.

1. Préparer les solutions de travail de conjugué de testostérone-HRP et de tampon de lavage.
2. Enlever le nombre requis de barrettes de microtitration. Refermer le sac et remettre toute barrette inutilisée au réfrigérateur.
3. Pipetter 25 µl de chaque calibrateur, contrôle et échantillon dans les puits correspondants étiquetés en double.
4. Pipetter 100 µl de solution de conjugué dans chaque puits (l'usage d'une pipette à multiples canaux est recommandé).
5. Secouer délicatement la plaque pendant 10 secondes.
6. Incuber la plaque à 37 °C pendant une 1 heure.
7. Laver les puits 3 fois avec 350 µl de tampon de lavage dilué par puits et taper la plaque fermement contre le papier absorbant pour s'assurer qu'elle est sèche (l'utilisation d'un laveur est recommandée).
8. Pipetter 150 µl de substrat de TMB dans chaque puits aux intervalles établis.
9. Incuber la plaque à 37 °C entre 10 et 15 minutes (ou jusqu'à ce que le calibrateur 0 prenne une couleur bleu foncé pour la DO désirée).
10. Pipetter 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits aux mêmes intervalles définis à l'étape 8.
11. Lire la plaque sur un lecteur de microplaque à 450 nm dans les 20 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

\* Si la DO dépasse la limite supérieure de détection ou si un filtre de 450 nm n'est pas disponible, il est possible de substituer ce dernier par un filtre de 405 ou 415 nm. Les densités optiques seront inférieures, toutefois, cela n'affectera pas les échantillons du patient/du contrôle.

## CALCULS

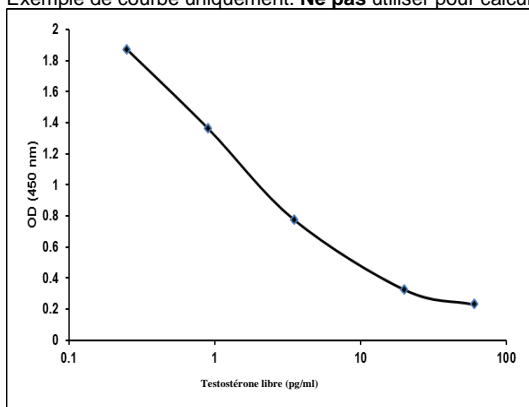
1. Calculer la moyenne de densité optique de chaque calibrateur double.
2. Dessiner une courbe d'étalonnage sur du papier semi-logarithmique avec la moyenne des densités optiques sur l'axe Y et les concentrations de calibrateur sur l'axe X. Si un logiciel d'essai immunologique est utilisé, une courbe à quatre paramètres ou cinq-paramètres est recommandée.
3. Calculer la moyenne de densité optique de chaque double inconnu.
4. Lire les valeurs des inconnues directement à partir de la courbe d'étalonnage.

## DONNÉES TYPES

Calibrateur	Moyenne de DO	Valeur (pg/ml)
0	2.292	0
1	1.680	0.1
2	1.181	1
3	0.780	5
4	0.426	20
5	0.214	60
Inconnu	1.066	1.59
Inconnu	0.441	19.6

## COURBE D'ÉTALONNAGE TYPE

Exemple de courbe uniquement. **Ne pas** utiliser pour calculer les résultats.



## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### SENSIBILITÉ

La limite de détection (LoD) est déterminée à partir de l'analyse de 64 répétées d'un échantillon de valeur faible et de LoB.

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1.645\sigma_S$$

où  $\sigma_S$  est la déviation standard de l'échantillon de valeur faible.

$\sigma_S$  a été déterminée comme étant 0.0093 sur base de 64 mesures de l'échantillon de valeur faible.

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

### ÉTUDES COMPARATIVES

La trousse DIASource d'essai direct de la Free testostérone ELISA (y) a été comparée à la trousse RIA d'éprouvette recouverte de testostérone libre des concurrents (x). La comparaison de 60 échantillons de sérum a produit les résultats de régression linéaire suivants :

$$y (\text{DIASource}) = 0.9362x (\text{concurrent}) + 3.8794$$

$$r = 0.97$$

### SPÉCIFICITÉ (RÉACTIVITÉ CROISÉE)

La réactivité croisée des composés suivants a été testée avec la trousse DIASource d'essai direct de la Free testostérone ELISA produisant une réaction croisée de la testostérone de 100 %.

Stéroïde	% de réactivité croisée
Testostérone	100
5 $\alpha$ -DHT	3.5
Androstènedione	0.17
Androstanediol	0.007
Progestérone	0.075
Androstérone	<0.008
Cholestérol	<0.0001
Corticostérone	0.0025
DHEA	0.071
DHEAS	0.0014
17 $\beta$ -estradiol	0.15
Estriol	<0.008
Prégnénolone	0.028

## PRECISION INTRA-ESSAI

Cinq échantillons ont été mis à l'essai 24 fois sur la même courbe d'étalonnage. Les résultats (en pg/ml) ont été tabulés ci-dessous :

Échantillon	Moyenne	% 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

## PRECISION INTER-ESSAIS

Trois échantillons ont été testés vingt fois sur une période de plus de 10 jours. Les résultats (en pg/ml) ont été tabulés ci-dessous :

Échantillon	Moyenne	% CV
1	3.53	8.1
2	13.8	11.5
3	23.3	6.9

## EFFET DE LA GLOBULINE LIÉE AUX HORMONES SEXUELLES (SHBG)

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence une interférence possible causée par la liaison de la SHBG au conjugué de testostérone-HRP. Un mélange de sérum humain dépourvu au charbon a été surchargé précisément avec de la SHBG à des concentrations allant de 6.25 à 200  $\mu\text{g/ml}$  et a été mis à l'essai avec la trousse DIASource d'essai de la Free testostérone ELISA. Les résultats (en pg/ml) ont été tabulés ci-dessous :

SHBG ajoutée	DO 450 nm	Pourcentage B/B <sub>0</sub> (%)
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

Les résultats ont montré les valeurs de pourcentage de fixation entre 90 et 100 % (Bo=sérum non surchargé) même à des taux de SHBG plus élevés que la normale. En conclusion, les résultats ont montré que la SHBG avait peu de fixation sur la trousse DIASource d'essai de la Free testostérone ELISA.

## VALEURS NORMALES ATTENDUES

Comme pour tous les essais cliniques, chaque laboratoire doit recueillir des données et définir sa propre plage de valeurs normales. Les résultats d'une étude de valeurs attendues sur des sujets apparemment normalement sains ont été les suivants (toutes les valeurs sont rapportées en pg/ml) :

Groupe : Sexe/âge	N	Plage de confiance 95 %	Plage Absolue
Hommes / < 13	44	-	ND-1.6
Hommes / 13-19	37	-	ND-22.3
Hommes / 20-39	120	9.1-32.2	-
Hommes / 40-59	120	5.7-30.7	-
Hommes / $\geq 60$	120	5.9-27.0	-
Femmes / < 13	63	-	ND-1.3
Femmes / 13-19	17	-	0.2-2.0
Femmes / 20-39	120	0.1-6.3	-
Femmes / 40-59	120	0.2-4.1	-
Femmes / $\geq 60$	60	0.5-3.9	-

## RÉFÉRENCES

1. Winter, S.J., et al., The Analog Free Testosterone Assay: Are the Results in Men Clinically Useful. Clin. Chem. 44 (10):2178-2182, 1998.
2. Ooi, D.S., et al., Establishing Reference Interval for DPC's Free Testosterone Radioimmunoassay. Clin. Biochem. 31(1):15-21, 1998.
3. Marcus, G.J., et al., A Simple Linked Immunoassay for Testosterone. Steroids 46:975, 1985.
4. Joshi, U.M., et al., A Sensitive Specific Enzyme Immunoassay for Serum Testosterone. Steroids 34:35, 1979.
5. Swinkels, L.M. J. et al., Salivary and Plasma Free Testosterone and Androstenedione Levels in Women. Am. Clin. Biochem. 25:354, 1988.
6. 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.
7. Ekins, R. Hirsutism: Free and Bound Testosterone. Ann. Clin. Biochem 27:91, 1990.

9. Manni, A., et al., Bioavailability of Albumin-Bound Testosterone. *J. Clin. Endo. Metab.* 61:705, 1985.
10. Ekins, R. The Science of Free Testosterone Measurement. *Proc.UK NEQAS Meeting.* 3:35-39, 1998.
11. Longcope, C, et al., Free Estradiol, Free Testosterone and Sex Hormone Binding Globulin in Perimenopausal Women. *J. Clin. Endo. Metab.* 64:513, 1987.
12. Vermeulen, A., et al., The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. *J. Clin. Endo. Metab.* 33:759, 1971.
13. Paulson, J.D., et al., Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. *Am. J. Obs. Gynecol.* 128:851, 1977.
14. Cumming D.C., et al., Non Sex Hormone Binding Globulin Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J. Clin. Endo. Metab.* 61:873, 1985.
15. Baxendale, P.M., et al., Salivary Testosterone Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hypeandrogenic Women. *Clin. Endocrinol.* 16:595, 1982.
16. Biffignandi, P., et al., Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. *Endocrinol Rev.* 5:488, 1984.
17. Wu, C.H., Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. *Obstet. Gynecol.* 60:188, 1982.
18. Bamman B.L., et al., Total and Free Testosterone During Pregnancy. *Am. J. Obsetet. Gynecol.* 137:293:1980.
19. Halpern, E.P. et al., Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. *Clin. Chem.* 26:68, 1980.
20. Wheeler, M.J., The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann. Clin. Biochem.* 32:345, 1995.
21. 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.

Date de révision : 2020-02-24



# Testosterona Libre Elisa

es

Para la determinación cuantitativa directa de Testosterona Libre por ensayo inmunoenzimático en suero humano.

## KAPDB260 DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

### USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de Testosterona Libre por inmunoensayo enzimático en suero humano. Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de este inmunoensayo enzimático presenta la típica situación de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no marcado (presente en los calibradores, las muestras de controles y del paciente) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) para un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en el pocillo de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantación eliminan el material que no se ha unido. Después de lavar, se agrega el sustrato de la enzima. La reacción enzimática se detiene agregando solución de parada. Se mide la absorbancia en un lector de microplacas. La intensidad del color resultante es inversamente proporcional a la concentración de testosterona libre en la muestra. Se usa un grupo de calibradores para producir una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de testosterona libre en las muestras de los pacientes y los controles.

El kit de testosterona libre de DIAsource utiliza un anticuerpo policlonal de conejo, anti testosterona altamente específico de baja afinidad (Keq x concentración) para disminuir al mínimo las alteraciones del equilibrio testosterona-proteína. Los otros componentes presentes en el sistema de la prueba también están optimizados de modo de no alterar la concentración original de testosterona libre.

### APLICACIONES CLÍNICAS

La testosterona es un esteroide C-19 secretado por los testículos y la corteza suprarrenal en los hombres y por los ovarios y la corteza suprarrenal en las mujeres. La testosterona también se produce en tejidos periféricos a partir de androsterediona que tiene muy poca importancia fisiológica en los hombres, sin embargo en las mujeres cerca de la mitad de la testosterona circulante deriva de este origen. Las mediciones de testosterona se usan principalmente para evaluación clínica del hipo gonadismo en hombres y estados hiper androgénicos en mujeres.

La testosterona circula en la sangre unida a tres proteínas: globulina transportadora de las hormonas sexuales (60-80%), globulina transportadora de albúmina y de cortisol. Sólo alrededor de 1-2% de la testosterona circulante total permanece libre. A pesar de que aún se está estudiando, la mayoría de los investigadores aceptan la determinación de testosterona libre como una medición de la fracción biológicamente activa. La determinación de testosterona libre se recomienda para superar la influencia causada por variaciones en el transporte de proteínas sobre la concentración total de testosterona.

### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben comprender en profundidad este protocolo para usar este kit exitosamente. Se obtendrá un funcionamiento confiable sólo adhiriéndose estricta y cuidadosamente a las instrucciones proporcionadas.
2. El material de control o conjuntos de sueros con niveles bajos y altos deben ser incluidos cada vez que se realice la prueba para evaluar la confiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique el uso de agua para dilución o reconstitución, use agua destilada o desionizada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente dañinas se deben usar guantes al manipular reactivos del kit y muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deben alcanzar temperatura ambiente y ser agitados suave pero rigurosamente antes de su uso. Evite congelar y descongelar los reactivos y muestras en forma repetida.
6. Se debe establecer una curva de calibración cada vez que se realiza la prueba.
7. El control debe ser incluido cada vez y estar entre los límites de confianza establecidos.
8. Cuando los valores del control no caen dentro de los rangos establecidos, puede estar indicando que no se han usado las técnicas adecuadas para el procedimiento o el que el pipeteo ha sido impreciso, que

el lavado ha sido incompleto o que el almacenaje de los reactivos ha sido inapropiado.

9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en el pocillo afectará la densidad óptica (DO). Remueva cuidadosamente todas las burbujas antes de leer.

10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe ser incolora si se almacena adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación y en este caso no debe usarse.

11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no use pipetas en las que estos líquidos puedan entrar en contacto con alguna parte metálica.

12. Para prevenir la contaminación de los reactivos, use una punta de pipeta desechable para cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezcle diferentes números de lotes de componentes de kits en una misma prueba y no use los componentes más allá de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse como desechos peligrosos y deben ser eliminados de acuerdo con las normativas nacionales.

### LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de testosterona libre en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de testosterona libre en otras muestras de origen humano o animal.

2. No use muestras que estén extremadamente hemolizadas, lipémicas o ictericas o suero que no ha sido almacenado en forma adecuada.

3. Cualquier muestra o suero de control que contenga azida o timerosal no es compatible con este kit ya que puede dar resultados falsos positivos.

4. Las muestras cuyos resultados sean superiores a 60 pg/ml no deben ser diluidas. La dilución alterará el equilibrio entre testosterona libre y proteínas séricas.

5. Los resultados obtenidos con este kit nunca deben usarse como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo la ocurrencia de anticuerpos heterofílicos en pacientes que habitualmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente pueden causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes del paciente, incluyendo la frecuencia con que ha estado expuesto a animales/productos si se sospecha que el resultado es un falso positivo.

### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y ADVERTENCIAS

#### MATERIAL POTENCIALMENTE BIPELIGROSO

El suero humano posiblemente usado en la preparación de los calibradores y controles ha sido analizado y encontrado no reactivo para el antígeno de superficie de la Hepatitis B y también ha sido examinado para la presencia de anticuerpos anti VHC y el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) para los que ha sido negativo. Sin embargo ningún examen puede ofrecer seguridad total de que el virus VIH, VHC y Hepatitis B o cualquier otro agente infeccioso estén ausentes. Los reactivos deben considerarse como potencialmente biopeligrosos y deben ser manipulados con las mismas precauciones aplicadas a cualquier muestra de sangre.

#### PELIGROS QUÍMICOS

Evite contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si toma contacto con cualquiera de estos agentes, lave con abundante agua. Se sospecha que TMB puede ser carcinogénico.

#### TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAJE

Se necesita aproximadamente 0,1 ml de suero por cada determinación en duplicado. Extraiga 4-5 ml de sangre en un tubo etiquetado en forma adecuada y déjela coagular. Centrifugue y remueva el suero cuidadosamente. Almacene a 4°C por hasta 24 horas o a -10°C o menos si los análisis deben realizarse en otro día. Considere todas las muestras humanas como material posiblemente biopeligroso y tome las precauciones adecuadas al manipularlas.

## TRATAMIENTO PREVIO DEL SUERO

Este ensayo es un sistema directo, no es necesario tratar las muestras previamente.

## REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión para dispensar 25, 50, 100, 150 y 350 µl
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Incubadora a 37 °C
5. Lector de microplacas con un filtro de 450nm y un límite superior de DO 3,0 o mayor.

## REACTIVOS SUMINISTRADOS

### **UL** Microplacas con Pocillos Desprendibles Recubiertos con Anticuerpos de Conejo Anti Testosterona Libre – Listo Para Usar.

Contenidos: Una microplaca de 96 pocillos (12x8) recubiertas con anticuerpo policlonal en una bolsa que se puede volver a sellar, con un desecativo.  
Almacenaje: Refrigerada a 2-8°C  
Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.

### **AG HRP CONC** Conjugado Concentrado – **X50** de Peroxidasa de Rábano Picante (HRP)-Testosterona Libre

Contenidos: Conjugado de Testosterona Libre-HRP en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.  
Volumen: 300 µl/vial  
Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C  
Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.  
Preparación: Diluya 1:50 en tampón de ensayo antes de usar (p.ej. 40 µl de HRP en 2 ml de tampón de ensayo). Si necesita usar toda la placa, diluya 240 µl de HRP en 12 ml de tampón de ensayo. Elimine lo que sobre.

### **CAL N** Calibradores de Testosterona Libre – Listo para Usar.

N = 0 a 5

Contenidos: seis viales que contienen testosterona en un tampón en base de suero humano con un conservante sin mercurio. Preparado agregándole al suero una cantidad precisa de testosterona equivalente aproximadamente a 0, 0.1, 1, 5, 20 and 60 pg/ml de testosterona libre.

\*Listadas abajo están las concentraciones aproximadas, por favor refiérase a la etiqueta del vial para concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen
Calibrador 0	0 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 1	0,1 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 2	1 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 3	5 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 4	20 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 5	60 pg/ml	0,5 ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses para viales sellados o lo que indique la etiqueta. Una vez abiertos los calibradores deben ser usados dentro de 14 días o almacenados congelados en alícuotas. Evite congelar y descongelar en forma repetida.

### **CONTROL** Controles – Listo Para Usar. N = 2

Contenidos: Dos viales contiene testosterona en un tampón en base a suero humano con un preservante sin mercurio. Preparado agregando el suero unas cantidades precisas de testosterona. Refiérase a las etiquetas del vial para el rango aceptable.

Volumen: 0,5 ml/vial

Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: 12 meses en los viales sellados o lo que indique la etiqueta. Una vez abierto el control debe ser usado dentro de 14 días o almacenado congelado en alícuotas. Evite congelar y descongelar en forma repetida.

### **WASH SOLN CONC** Concentrado de Tampón de Lavado - **X10**

Contenidos: Una botella con tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.

Volumen: botella de 50 ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.

Preparación: Diluya 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si debe usar toda la microplaca diluya 50 ml del tampón de lavado en 450 ml de agua.

### **ASS BUF**

### Tampón de Ensayo – Listo Para Usar.

Contenidos: Una botella con un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: botella de 15 ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.

### **CHROM TMB**

### TMB Sustrato – Listo Para Usar.

Contenidos: Una botella con Tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF o DMSO.

Volumen: 16 ml/botella

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.

### **STOP SOLN**

### Solución de Parada – Lista Para Usar.

Contenidos: Un botella con ácido sulfúrico 1M.

Volumen: botella de 6ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o lo que indique la etiqueta.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### Tratamiento previo de la muestra:

Ninguno.

Todos los reactivos deben alcanzar temperatura ambiente antes de su uso. Los calibradores, controles y muestras deben ser analizados en duplicado. Una vez que el procedimiento ha comenzado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

1. Prepare soluciones de trabajo del conjugado de Testosterona Libre-HRP y del tampón de lavado.
2. Retire la cantidad necesaria de tiras de la microplaca. Selle la bolsa nuevamente y devuelva las tiras que no usará al frigorífico.
3. Pipetee 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondientes debidamente etiquetados, en duplicado.
4. Pipetee 100 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (Recomendamos que use una pipeta multicanal).
5. Agite suavemente la microplaca por 10 segundos.
6. Incube la placa a 37°C por 1 hora.
7. Lave los pocillos 3 veces con 350 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y golpee la placa firmemente sobre una toalla absorbente para asegurarse que quede seca (se recomienda el uso de un lavador de placas)
8. Pipetee 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos determinados.
9. Incube la placa a 37°C por 10-15 minutos (o hasta que el calibrador 0 se vuelva de un color azul oscuro para la DO deseada).
10. Pipetee 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos determinados en el paso 8.
11. Lea la placa en un lector de microplacas a 450 nm dentro de 20 minutos de haber agregado la solución de parada.

\* Si la DO excede el límite superior de detección o si no se dispone de un filtro de 450 nm, se puede sustituir por un filtro de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán más bajas, sin embargo esto no afectará el resultado de las muestras de pacientes/control.

## CÁLCULOS

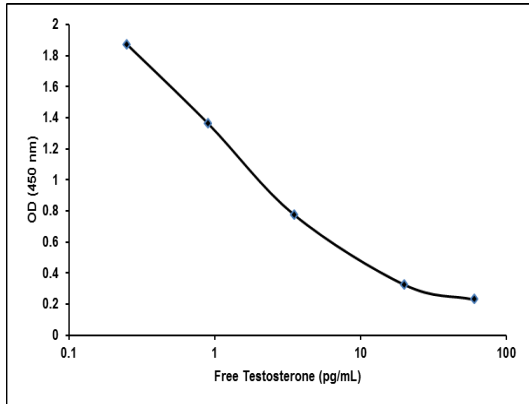
1. Calcule la densidad óptica promedio para cada calibrador en duplicado.
2. Dibuje una curva de calibración en papel semi-log con la densidad óptica promedio en el eje Y y las concentraciones de los calibradores en el eje X. Si está usando software de inmunoensayo, se recomienda usar una curva con 4 parámetros o 5 parámetros.
3. Calcule la densidad óptica promedio de cada duplicado de muestra desconocida.
4. Lea los valores de las muestras desconocidas directamente en la curva de calibración.

## DATOS TÍPICOS TABULADOS

Calibrador	DO Promedio (450nm)	Valor (pg/ml)
0	2.292	0
1	1.680	0.1
2	1.181	1
3	0.780	5
4	0.426	20
5	0.214	60
Desconocido	1.066	1.59
Desconocido	0.441	19.6

## CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

Esta curva es sólo un ejemplo. **No** la use para calcular resultados.



## CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO SENSIBILIDAD

El límite de detección (LoD) fue determinado a partir del análisis de 64 repetidos de un valor bajo y a partir del LoB

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1.645\sigma\text{S}$$

Donde  $\sigma\text{S}$  es la desviación estándar basada en 64 medidas de valores bajos de muestra

$$\text{LoD} = 0.0025 + (1.645 \times 0.0093) = 0.018 \text{ pg/mL}$$

## ESTUDIOS COMPARATIVOS

El kit ELISA para Testosterona Libre de DAsource (y) fue comparado con un kit RIA en Tubo Recubierto con Testosterona Libre (x), de la competencia. La comparación de 60 muestras de suero dieron los siguientes resultados en regresión lineal:

$$y (\text{DAsource}) = 0.9362x (\text{competencia}) + 3.8794$$

$$r = 0,97$$

## ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Los siguientes compuestos fueron analizados para reactividad cruzada con el kit ELISA para Testosterona Libre de DAsource con testosterona con reacción cruzada al 100%.

Esteroides	% de Reacción Cruzada
Testosterone	100
5 $\alpha$ -DHT	3.5
Androstenedione	0.17
Progesterone	0.007
Androsterone	0.075
Aldosterone	<0.008
Colesterol	<0.0001
Corticosterona	0.0025
DHEA	0.071
DHEAS	0.0014
17 $\beta$ -Estradiol	0.15
Estriol	<0.008
Pregnenolona	0.028

## PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Se ensayaron cinco muestras veinticuatro veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	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

## PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Se ensayaron tres muestras veinte veces en un periodo superior a diez días. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	CV%
1	3.53	8.1
2	13.8	11.5
3	23.3	6.9

## EFFECTO DE LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE LAS HORMONAS SEXUALES (SHBG)

El propósito de este estudio fue de investigar una posible interferencia causada por la unión de SHBG al conjugado de peroxidasa de rábano picante – testosterona libre. A un conjunto de sueros humanos tratados con carbón se les agregó SHBG en forma precisa en concentraciones variando entre 6.25 – 200  $\mu\text{g/ml}$  y fueron ensayados con el kit ELISA para Testosterona Libre de DAsource. Los resultados están en la siguiente tabla. (en pg/ml):

SHBG Agregado	DO 450nm	Porcentaje B/B <sub>0</sub> (%)
0 $\mu\text{g/ml}$	2.37	100.0
6.25 $\mu\text{g/ml}$	2.37	99.9
12.5 $\mu\text{g/ml}$	2.34	98.7
50 $\mu\text{g/ml}$	2.36	99.5
200 $\mu\text{g/ml}$	2.27	95.6

Los resultados mostraron un % de valores delimitados entre 95-100% (B<sub>0</sub>= suero sin agregado) incluso más elevados que los valores normales de SHBG. En conclusión los resultados mostraron que no hay una influencia significativa de SHBG sobre el kit ELISA para Testosterona Libre de DAsource.

## VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe reunir sus datos y establecer su propio rango de valores normales esperados. Los resultados de un estudio de rango de valores esperados en sujetos aparentemente normales y saludables dio los siguientes resultados (todos los valores en pg/ml):

Cohorte grupo: Género/edad	N	95% rango de confianza	Alcance Absoluto
Hombre / < 13	44	-	ND-1.6
Hombre / 13-19	37	-	ND-22.3
Hombre / 20-39	120	9.1-32.2	-
Hombre / 40-59	120	5.7-30.7	-
Hombre / $\geq$ 60	120	5.9-27.0	-
Mujer / < 13	63	-	ND-1.3
Mujer / 13-19	17	-	0.2-2.0
Mujer / 20-39	120	0.1-6.3	-
Mujer / 40-59	120	0.2-4.1	-
Mujer / $\geq$ 60	60	0.5-3.9	-

## REFERENCIAS

- 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.
- Ekens, 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.
- Ekens, 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.

12. Vermeulen, A., et al., The Apparent Free Testosterone Concentration: An Index of Androgenicity. *J. Clin. Endo. Metab.* 33:759, 1971.
13. Paulson, J.D., et al., Free Testosterone Concentration in Serum. Elevation is the Hallmark of Hirsutism. *Am. J. Obs. Gyneco.* 128:851, 1977.
14. Cumming D.C., et al., Non Sex Hormone Binding Globulin Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J. Clin. Endo. Metab.* 61:873, 1985.
15. Baxendale, P.M., et al., Salivary Testosterone Relationship to Unbound Plasma Testosterone in Normal and Hypeandrogenic Women. *Clin. Endocrinol.* 16:595, 1982.
16. Biffignandi, P., et al., Female Hirsutism: Pathophysiological Considerations and Therapeutics Implications. *Endocrinol Rev.* 5:488, 1984.
17. Wu, C.H., Plasma Free and Protein-Bound Testosterone in Hirsutism. *Obstet. Gynecol.* 60:188, 1982.
18. Bamman B.L., et al., Total and Free Testosterone During Pregnancy. *Am. J. Obsetet. Gynecol.* 137:293:1980.
19. Halpern, E.P. et al., Production of Anti-Testosterone Antisera in Rabbits. *Clin. Chem.* 26:68, 1980.
20. Wheeler, M.J., The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann. Clin. Biochem.* 32:345, 1995.
21. 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.

Fecha de revisión: 2020-02-24