

# Product information

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



## User's Manual

# Testosterone free in Saliva ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of free active testosterone in saliva

IVD



REF

DES6622



96 wells

## CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
4	REAGENTS PROVIDED .....	5
5	SPECIMEN .....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	8
8	QUALITY CONTROL .....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	9
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE .....	11
11	LEGAL ASPECTS .....	12
12	REFERENCES .....	13
1	EINLEITUNG .....	14
2	TESTPRINZIP .....	14
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	15
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	16
5	PROBENVORBEREITUNG .....	17
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	18
7	ERWARTETE WERTE .....	19
8	QUALITÄTS-KONTROLLE .....	19
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	20
10	GRENZEN DES TESTS .....	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	21
12	REFERENZEN .....	21
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	24

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

An Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of free active testosterone in saliva. Measurement of testosterone is used in the diagnosis and treatment of disorders involving the male sex hormones (androgens), including primary and secondary hypogonadism, delayed or precocious puberty, impotence in males and in females hirsutism (excessive hair) and virilization (masculinization) due to tumors, polycystic ovaries, and adrenogenital syndromes.

### 1.2 Summary and explanation

At present, the majority of steroid hormone determinations are conducted from serum samples, even if results in the low or very low concentration range are expected, for example, in elderly patients. This is a real challenge for any diagnostic laboratory as shown by Taieb et al in 2003<sup>(10)</sup> and others<sup>(9)</sup>. Recently there has been an official position statement of the Endocrine Society<sup>(14)</sup> stating that reliable Testosterone measurements in serum either need an extraction step or have to be done by chromatographic methods like Tandem MS or GCMS. There now is sufficient evidence that the commercial Testosterone assays are unable to quantify low concentrations in a reliable way.

Another major problem associated with the measurement of free hormone levels from serum is the episodic secretion pattern of steroid hormones. Even in 1973<sup>(1)</sup> it could be shown that steroid secretion shows a significant episodic pattern. Nevertheless, the majority of the determinations are still made from just one serum sample, resulting in non-reproducible values due to the biological variation. In general, serum measurements can only give the total steroid hormone concentration, whereas saliva testing results in the measurement of the free active hormone fraction<sup>(3,5)</sup>.

So far, all attempts for a direct quantification of free Testosterone in serum or plasma samples by commercial immunoassays have failed<sup>(7)</sup>.

Taking into consideration the above mentioned drawbacks of the current analytical procedures, salivary testing seems to be a reliable alternative. It has been shown in the literature<sup>(3,5,13,15)</sup> that the measurement of free salivary Testosterone gives clinically valid results even in the low concentration range. In salivary testing it is easy to compensate for the episodic secretion pattern provided multiple sampling is done (preferably 5 samples within 2 hours). The measurement of free Testosterone is done with a mixture of these 5 samples. In contrast to this, measurements from just one single saliva sample always will give arbitrary results (like in serum).

## 2 PRINCIPLE

The **DEMEDIATEC Testosterone free in Saliva ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding. An unknown amount of free testosterone present in the sample and a defined amount of testosterone conjugated to horseradish peroxidase compete for the binding sites of rabbit polyclonal testosterone antiserum coated to the wells of a microplate. After one-hour incubation on a shaker the microplate is washed four times. After addition of the substrate solution the concentration of testosterone is inversely proportional to the optical density measured.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

## 4 REAGENTS PROVIDED

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT** Microtiter Plate, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with an anti-Testosterone antibody (rabbit polyclonal antibody).
2. **CAL 0** Calibrator 0, 1 vial, 3.0 ml, ready to use
3. **CAL 1-5** Calibrator (Calibrator 1-5), 5 vials, 1 ml each, ready to use;  
Concentrations: 10 – 30 – 100 – 300 – 1000 pg/ml  
Conversion: Testosterone (pg/ml) x 3.47 = pmol/l
4. **CONTROL 1-2** Control 1 (low), Control 2 (high), 2 vials, 1.0 ml each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
5. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 12 ml, ready to use;  
Testosterone conjugated to horseradish peroxidase;
6. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 22 ml, ready to use;  
contains tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 7 ml, ready to use;  
contains 2 N Hydrochloric Acid solution.
8. **WASH SOLN 10x** Wash Solution, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);  
see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Calibrator 0* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450nm
- Microplate mixer operating more than 600 rpm
- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes (50 µl, 100 µl, 200 µl).
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

### 4.4 Reagent preparation

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

#### Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.

*The diluted Wash Solution is stable for at least 3 months at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

#### 4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

### 5 SPECIMEN

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination. Blood contamination will give falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

#### 5.1 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices for sampling to avoid significant interferences. Glass tubes can be used as well, but in this case special attention is necessary for excluding any interference caused by the stoppers. For more details please contact Demeditec Diagnostics. As the Testosterone secretion in saliva as well as in serum shows an obvious episodic secretion pattern it is important to care for a proper timing of the sampling. In order to avoid arbitrary results we are recommending to collect 5 samples within a period of 2 hours (multiple sampling) preferably in the early morning of a normal day directly after waking up. As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem the collection period should be timed just before lunch or before dinner. In the early morning Testosterone levels of males are significantly higher compared to those ones during the day. The Testosterone concentration in the morning is roughly twice as high compared to the evening concentration.

Do not chew anything during the sampling period. Any pressure to the teeth may result in falsely elevated measurements due to an elevated content of gingival liquid in the saliva sample.

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for up to seven days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create any problem. Storage at 4°C can be done for a period of up to one month. Whenever possible, samples should preferably be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is not a problem. Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow in order to separate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples at the lab the samples have to be kept frozen at least overnight. Next morning the samples are thawed and mixed carefully. The samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. The clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slighty red color it should be discarded. Otherwise the value most probably will be falsely elevated. Due to the episodic variations of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. If such a set of multiple samples has to be tested the staff of lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) should mix aliquots of the 5 single samples and perform the determination using the mixture.

#### 5.3 Specimen Dilution

Samples expected to contain testosterone concentrations higher than the highest calibrator (1000 pg/ml) should be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the result.

Example:

- a) Dilution 1:10:            10 µl saliva + 90 µl Calibrator 0 (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100:        10 µl of dilution a) + 90 µl Calibrator 0 (mix thoroughly).

---

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

### 6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators, controls and patient samples.
2. Dispense **100 µl** of each **calibrator, control and sample** with new disposable tips into appropriate wells
3. Dispense **100 µl** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a Microplate mixer ( $\geq 600$  rpm).

#### **Important Note:**

Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!

5. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted Wash Solution (300 µl per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** in the dark.
8. Stop the reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

### 6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### **Conversion to SI units:**

Testosterone (pg/ml) x 3.47 = pmol/l

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

Following data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Standard	Optical Units (450nm)
Calibrator 0 (0 pg/ml)	2.267
Calibrator 1 (10 pg/ml)	2.040
Calibrator 2 (30 pg/ml)	1.721
Calibrator 3 (100 pg/ml)	1.019
Calibrator 4 (300 pg/ml)	0.592
Calibrator 5 (1000 pg/ml)	0.299

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of salivary Testosterone, saliva samples from children, adult male and adult female apparently healthy subjects were collected in the morning and analyzed using the DEMEDITEC Testosterone free in Saliva ELISA kit. The following ranges are calculated with the results of this study.

The concentrations are given in pg/ml.

Age Group Years	Men ♂			Women ♀		
	5 <sup>th</sup> -95 <sup>th</sup> Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n	5 <sup>th</sup> -95 <sup>th</sup> Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
15 – 55	33.6 – 205.0	90.0	83	11.6 – 88.1	33.8	538
>55	25.1 – 140.7	68.3	42	9.3 – 83.0	27.2	137

Age Group Years	Children		
	5 <sup>th</sup> -95 <sup>th</sup> Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
≤ 11	5.8 – 45.3	11.5	8

The results alone should not be the only reason for therapy. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests. Since testosterone levels show diurnal cycles, we recommend that the samples should be obtained at the same time each day. Because of differences which may exist between laboratories and location with respect to population, laboratory technique and selection of reference group, it is important for each laboratory to establish the appropriateness of adopting the reference range suggested here.



## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls should be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to national regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated at the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of testosterone that can be distinguished from the Zero Calibrator is 2.2 pg/ml at the 2SD confidence limit.

### 9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Testosterone.

Steroid	% Cross reaction
Testosterone	100%
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	23.3%
Androstenedione	32.2%
Androsteron	< 0.1%
5 $\alpha$ -Androstane	< 0.1%
5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diole	< 0.1%
Corticosterone	< 0.1%
11-Desoxycorticosterone	< 0.1%
Dexamethasone	< 0.1%
Estradiol	< 0.1%
Progesterone	< 0.1%
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	< 0.1%
Cortisol	< 0.1%
11-Desoxycortisol	< 0.1%
Cortison	< 0.1%
Estrone	< 0.1%
Pregenolone	< 0.1%
Prednisone	< 0.1%
Prednisolon	< 0.1%
Prednisone	< 0.1%
Danazol	< 0.1%

### 9.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 10 – 1000 pg/ml.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 3 saliva samples within one run. The within-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Mean (pg/ml)</b>	61.0	90.7	216.3
<b>SD</b>	5.92	6.57	11.92
<b>CV (%)</b>	9.7	7.2	5.5
<b>n =</b>	20	20	20

#### 9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of 3 saliva samples over 10 days.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Mean (pg/ml)</b>	53.4	74.6	288.3
<b>SD</b>	10.42	5.90	27.74
<b>CV (%)</b>	9.9	7.9	9.6
<b>n =</b>	11	11	11

### 9.5 Recovery

Using the Calibrator Matrix six spiking solutions were prepared (A = 2000 pg/ml, B = 4000 pg/ml, C = 6000 pg/ml, D = 500 pg/ml, E = 1000 pg/ml and F = 2000 pg/ml). A 25 µL aliquot of each solution was spiked into 475 µl of different salivas, for a spiking ratio of 1 to 20, leaving the saliva matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then measured by Salivary Testosterone procedure. To calculate expected values 95% of the unspiked values were added to 5% of the spiking solution concentrations.

Sample	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)	Sample	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
1	61.8	-	-	4	87.3	-	-
	153.3	158.7	96.6		105.8	107.9	98.0
	259.0	258.7	100.1		125.8	132.9	94.7
	365.0	358.7	101.8		195.6	182.9	106.9
2	74.0	-	-	5	71.1	-	-
	164.6	170.3	96.6		85.6	92.5	92.5
	270.4	270.3	100.0		94.5	117.5	80.4
	345.4	370.3	93.3		154.9	167.5	92.5
3	30.9	-	-	6	74.7	-	-
	49.4	54.3	91.0		87.9	95.9	91.6
	76.6	79.3	96.6		140.3	120.9	116.0
	109.0	129.3	84.3		168.4	170.9	98.5

## 9.6 Linearity

Six saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with zero standard and assayed with the DEMEDITEC ELISA. Four native samples were serially diluted, and two samples were spiked with testosterone and then serially diluted up to 1:8. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for testosterone.

Saliva	Dilution	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Linearity (%)
1	native	224	-	-
	1 in 2	118	112	105%
	1 in 4	51	56	91%
	1 in 8	27	28	96%
2	native	205	-	-
	1 in 2	110	103	107%
	1 in 4	50	51	98%
	1 in 8	27	26	104%
3	native	106.7	-	-
	1 in 2	55.6	53.4	104%
	1 in 4	27.7	26.7	104%
	1 in 8	11.9	13.3	89%
4	native	66.6	-	-
	1 in 2	28.9	33.3	87%
	1 in 4	12.3	16.70	74%
	1 in 8	6.9	8.30	83%
5	native	91.1	-	-
	1 in 2	51.1	45.6	112%
	1 in 4	26.3	22.8	115%
	1 in 8	12.9	11.4	113%
6	native	133.7	-	-
	1 in 2	62.6	66.9	94%
	1 in 4	33.0	33.4	99%
	1 in 8	19.5	16.7	117%

## 10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye.

### 10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill, etc.) containing testosterone of course will significantly influence the measurement of this analyte.

## **11 LEGAL ASPECTS**

### **11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

### **11.2 Therapeutic Consequences**

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### **11.3 Liability**

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

---

**12 REFERENCES**

1. Charles D. West et.al. (1973): Simultaneous Measurement of Multiple Plasma Steroids by Radioimmunoassay Demonstrating Episodic Secretion. *J Clin Endocrin Metabol* Vol. 36 (No.6), pages 1230 – 1236.
2. Charles D. West et.al. (1973): Simultaneous Measurement of Multiple Plasma Steroids by Radioimmunoassay Demonstrating Episodic Secretion. *J Clin Endocrin Metabol* Vol. 36 (No.6), pages 1230 – 1236.
3. G.E.Butler et. al. (1989): Salivary Testosterone levels and the progress of puberty in the normal boy. *Clin Endocrin* Vol 30, pages 587 – 596
4. Josko Osredkar et. al. (1989): Salivary free testosterone in hirsutism *Ann. Clin. Biochem.* Vol. 26, pages 522 – 526
5. James M. Dabbs et. al. 1995: Reliability of salivary testosterone measurements: A Multicenter Evaluation *Clin. Chem.* Vol. 41 (11), pages 1581 – 1584
6. J. Valero-Politi, X. Fuentes-Arderiu 1996: Daily rhythmic and non-rhythmic variations of LH, FSH, SHBG, and Testosterone in men *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* Vol. 34, pages 455 – 462
7. William Rosner 2001: An extraordinarily inaccurate assay for free Testosterone is still with us. *J Clin Endocrin Metabol* Vol.86 (6), page 2903
8. Karen K. Miller et. al. 2004: Measurement of free Testosterone in normal women and women with androgen deficiency: Comparison of methods *J Clin Endocrin Metabol* Vol. 89 (2), pages 525 – 533
9. Frank Z. Stanczyk et. al. 2003: Limitations of direct Estradiol and Testosterone immunoassay kits. *Steroids* Vol. 68, pages 1173 – 1178
10. Joelle Taieb et. al. (2003): Testosterone Measured by 10 Immunoassays and by Isotope-Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem* Vol. 49 (8), pages 1381 – 1250
11. Sterzer et al. (2015): Intentional updating in episodic memory: Low testosterone associates with enhanced memory updating *Neuroendocrinology Letters* Volume 36, No. 3
12. John G. Lewis 2006: Steroid analysis in saliva: An overview (Review article). *Clin Biochem Rev.* Vol.27, pages 139-146
13. J.E. Morley et. al. 2006: Validation of salivary Testosterone as a screening test for male hypogonadism. *Aging Male* Vol.9, pages 165-169
14. W. Rosner 2007: Utility, Limitations, and pitfalls in measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement *J Clin Endocrin Metabol* Vol. 92 (2), pages 405-413
15. M. Yasuda et. al. 2007: Low testosterone level of middle-aged Japanese men – the association between low testosterone levels and quality of life. *Journal of Men's Health and Gender* Vol. 4 (2), pages 149-155
16. Reimers L. & Diekhof EK (2015): Testosterone is associated with cooperation during intergroup competition by enhancing parochial altruism. *Frontiers in Neuroscience*, June 2015, Volume 9, Article 183

## 1 EINLEITUNG

### Nur für In-vitro Diagnostik.

Der DEMEDITEC Testosteron free in Saliva ELISA ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung des freien Testosterons in Speichelproben.

Die Bestimmung des Testosterons ist wichtig zur Abklärung von verschiedenen endokrinologischen Fragestellungen, weist aber eine Limitierung in niedrigen Konzentrationsbereichen auf. Doch gerade dieser Bereich ist von besonderer diagnostischer Bedeutung. In einer bedeutenden Studie von Taieb et al. 2003<sup>(10)</sup> wurde gezeigt, dass keine der 10 überprüften Testmethoden ausreichend zuverlässig war, um bei Frauen oder Kindern das Testosteron in Serumproben zu bestimmen, da hier die Konzentrationen relativ niedrig sind.

Dieser Befund wurde im Jahre 2007 bestätigt durch ein offizielles Position Statement der Endocrine Society der USA<sup>(14)</sup>, in dem dringend davor gewarnt wird, mit den zur Zeit verfügbaren kommerziellen Analysemethoden Serumkonzentrationen des Testosterons im niedrigen Bereich zu messen. Dies funktioniert in zuverlässiger Weise nur nach Extraktion oder mit chromatographischen Methoden wie GCMS oder LCMS. In der Realität werden heute aber nahezu ausschließlich die vollautomatischen kommerziellen Testmethoden angewendet, die jetzt wohlbegründet als unzuverlässig bezeichnet werden können<sup>(9)</sup>.

Eine direkte Bestimmung des freien Testosterons in Serum- oder Plasmaproben ist mit kommerziellen Assays nicht mit akzeptabler Zuverlässigkeit möglich<sup>(7)</sup>.

Darüber hinaus stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, wie repräsentativ eine Einzelprobe für die Analytik der Steroide ist. Dazu wurden bereits vor 3 Jahrzehnten grundlegende Untersuchungen publiziert, die allesamt zeigen, dass die Sekretion der Steroide aufgrund der negativen Rückkopplung mit der Hypophyse und dem Hypothalamus einem ausgeprägten episodischen Muster folgt<sup>(1)</sup>. Dabei sind Kurzzeitschwankungen innerhalb von ca. 1-2 Stunden um den Faktor 2-3 durchaus die Regel. Daher ist auch bei einer Bestimmung der Steroidhormone aus einer Einzelprobe kein reproduzierbares Ergebnis zu erwarten.

Aus den vorgenannten Gründen stellt die Bestimmung des freien Testosterons in Speichelproben eine attraktive Alternative dar. Hierbei kann man die episodischen Sekretionsmuster relativ einfach durch Mehrfachprobengewinnung ausgleichen. Man misst dazu ein Gemisch aus 5 Einzelproben, die im Verlaufe von 2 Stunden vom Patienten abgenommen werden. In zahlreichen Publikationen konnte inzwischen gezeigt werden, dass die Speichelanalytik eine gute Alternative zur Bestimmung des Testosterons gerade im erniedrigten Konzentrationsbereich darstellt.

## 2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Testosterone free in Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen das Testosteron-Molekül gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem Testosteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Testosteron aus der Probe mit dem Testosteron-Enzymkonjugat um die Bindungsstellen auf den beschichteten Vertiefungen. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Testosteron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

### 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Tastensatz auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

- SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; mit anti-Testosteron-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper) beschichtet.
- CAL 0 Standard 0**, 1 Fläschchen, 3 ml, gebrauchsfertig
- CAL 1-5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 10 – 30 – 100 – 300 – 1000 pg/ml  
Umrechnungsfaktor: Testosteron (pg/ml) x 3.47 = pmol/l.
- CONTROL 1-2 Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 1 ml; gebrauchsfertig  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
- ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 12 ml, gebrauchsfertig; Testosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
- SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
- STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; Enthält 2 N Salzsäure.
- WASH SOLN 10x Waschlösung, 10X** konzentriert, 1 Fläschchen, 50 ml; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Zentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 rpm
- Vortex-Mixer
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### **Waschlösung**

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für mindestens 12 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt.



#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein und keine geringfügige Rotfärbung durch eine Blutkontamination aufweisen. Eine Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode immer einen zu hohen Wert ergeben. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass der Patient die Probe verwirft, 10 Minuten wartet und dann eine neue Probe nimmt. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen aus dem Zahnfleisch und damit erhöhten Messwerten führen.

#### 5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden. PE-enhaltende Behältnisse sind zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet, allerdings muss darauf geachtet werden, dass verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigen, was bei PE-Stopfen aber zu erwarten ist.

Da die Sekretion des Testosterons eine ausgeprägte episodische Dynamik zeigt, ist eine Sammelstrategie anzuwenden, die Zufallsergebnisse vermeidet. Wir empfehlen daher stets die Entnahme von Mehrfachproben. Dazu sollte man in einem Zeitraum von 2 Stunden 5 Proben im Abstand von jeweils 30 Minuten sammeln. Während dieser Sammelperiode darf keine Nahrung aufgenommen werden, während Wasser jederzeit getrunken werden darf.

Die Sammelperiode legt man am besten direkt vor eine geplante Mahlzeit. Vor der Sammelperiode sollte 3 Stunden lang gar nichts gegessen werden. Davor kann aber eine leichte Mahlzeit eingenommen werden, wobei hormonhaltige Nahrungsmittel vermieden werden sollten (z.B. Fleisch oder Milch). Da die Testosteron-Konzentration bei Männern am frühen Morgen deutlich erhöht ist und nach dem Erwachen steil abfällt, sollte dieses bei der Probennahme berücksichtigt werden. Die Testosteronkonzentration ist am Morgen ungefähr doppelt so hoch wie am Abend.

Bezüglich einer eventuellen Rotfärbung der Proben siehe Anfang des Kapitels 5.

#### 5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Die Proben können falls erforderlich mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Daher kann man diese Proben auch problemlos und ohne Kühlung per Post versenden. Eine Aufbewahrung bei 4°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einem Monat lang vorgenommen werden. Wenn möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. In jedem Falle muss jede Speichelprobe ohnehin zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Mucine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die 5 zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Sodann werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen.

#### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit Standard 0 weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

##### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Speichelprobe + 90 µl Standard 0 (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a + 90 µl Standard 0 (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **100 µl Standards, Kontrollen und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **100 µl Enzymkonjugat** in jede Vertiefung geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubieren ( $\geq 600$  rpm).

**Achtung:**

Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!

5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopp-Lösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Umrechnung in SI Einheiten:

Testosterone (pg/ml) x 3.47 = pmol/l

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC Testosterone free in Saliva ELISA gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	2.267
Standard 1 (10 pg/ml)	2.040
Standard 2 (30 pg/ml)	1.721
Standard 3 (100 pg/ml)	1.019
Standard 4 (300 pg/ml)	0.592
Standard 5 (1000 pg/ml)	0.299

## 7 ERWARTETE WERTE

In einer Studie wurden die Speichelproben von gesunden Männern, Frauen und Kindern untersucht. Die Proben wurden morgens gesammelt. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Testosterone free in Saliva ELISA folgende Werte (in pg/ml):

Alter (Jahre)	Männer ♂			Frauen ♀		
	5.-95. Perzentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n	5.-95. Perzentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
15 – 55	33.6 - 205.0	90.0	83	11.6 – 88.1	33.8	538
>55	25.1 - 140.7	68.3	42	9.3 – 83.0	27.2	137

Alter (Jahre)	Kinder		
	5.-95. Perzentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
≤ 11	5.8 - 45.3	11.5	8

Testosteronwerte im Speichel zeigen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests.

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

## **9 ASSAY CHARACTERISTIKA**

### **9.1 Analytische Sensitivität**

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 beträgt 2,2 pg/ml.

### **9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)**

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### **9.3 Messbereich**

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 10 – 1000 pg/ml.

Die Daten zu:

### **9.4 Präzision**

### **9.5 Wiederfindung**

### **9.6 Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## **10 GRENZEN DES TESTS**

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### **10.1 Interferenzen**

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

Konzentrationen von Natriumazid über 0,02 % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

### **10.2 Beeinflussung durch Medikamente**

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die Testosteron enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.












## **12 REFERENZEN**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.





**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore