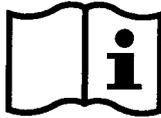
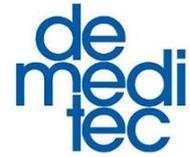


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Testosterone free in Saliva ELISA



DES6622



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS PROVIDED	4
5	SPECIMEN	5
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	10
11	LEGAL ASPECTS	10
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE	11
13	REFERENCES	11
1	EINLEITUNG	13
2	TESTPRINZIP	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	14
4	BESTANDTEILE DES KITS	15
5	PROBENVORBEREITUNG	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG	17
7	ERWARTETE WERTE	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE	18
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	19
10	GRENZEN DES TESTS	21
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	21
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG	22
13	REFERENZEN	22

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of testosterone in human saliva.

The assay is intended for *in-vitro* diagnostic use by professional users only. All therapeutic consequences must take not only the test result but always also all clinical and laboratory diagnostic results into account. The laboratory values themselves must never be the sole reason for therapeutic consequences derived from them. Manual processing is recommended. The usage of laboratory automats is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

1.2 Description of the analyte

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 challenge for any diagnostic laboratory as shown by Taieb et al. in 2003 [9] and others [8]. There has been an official position statement of the Endocrine Society [13] stating that reliable testosterone measurements in serum need either 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 [1] 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 [2-4].

So far, all attempts for a direct quantification of free testosterone in serum or plasma samples by commercial immunoassays have failed [6].

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 [2, 4, 12, 14] 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 five samples within two hours). The measurement of free testosterone is done with a mixture of these five samples. In contrast to this, measurements from just one single saliva sample always will give arbitrary results (like in serum).

Measurement of salivary testosterone is used as an adjunct in the diagnosis of disorders involving the male sex hormones (androgens), including primary and secondary hypogonadism, impotence in males and in females hirsutism (excessive hair) and virilization (masculinization) due to polycystic ovaries, and adrenogenital syndromes. Salivary testosterone further permits a good non-invasive characterization of pubertal maturation stages [15].

2 PRINCIPLE

The Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and enzyme-labeled antigen compete for the binding sites of antibodies coated onto the wells. After incubation, the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of testosterone in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of testosterone in the sample. The enzymatic reaction is stopped by addition of stop solution and the optical density (OD) is measured. A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

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 break apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°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 substrate solution that had previously been used for 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 washing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
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 protective 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 microtiter plate 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 be slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water
18. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
19. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
20. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

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;
containing defined concentration of testosterone in buffer solution.
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;
containing defined concentration of testosterone in buffer solution
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; containing <0.01% CMIT/MIT and <0.02% MIT.
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.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see „Preparation of Reagents“ (4.4).

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Microtiter plate mixer operating at 900 rpm
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Absorbent paper
- Deionized water
- Timer
- Semilogarithmic graph paper or software for data reduction
- Vortex mixer
- Microcentrifuge

4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°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. Keep away from heat and direct sunlight.

Microtiter wells must be stored at 2-8°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 (18-25°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 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

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 Diagnostics GmbH 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. Do not use Salivette tubes for sampling. 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 two 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 may be stored at 2-8°C for up to one week. For longer storage, it is recommended to store the samples at ≤-20°C. Repeated thawing and freezing is not a problem, however this should be avoided to a minimum. 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 colourless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slightly red colour, it should be discarded. Blood contamination might influence the results and leads to false results. 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) must be diluted with the zero calibrator before assayed. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the result.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) 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.
- Optical density 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.
- Calibrators, controls, and samples should at least be assayed in duplicates.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with wash solution, and that there are no residues in the wells.
- A calibrator curve must be established for every run.

6.2 Assay procedure

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 (18-25°C) on a Microtiter plate mixer (900 rpm).

Important Note:

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

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 Microtiter plate on absorbent paper.
6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) without shaking in the dark.
8. Stop the reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density 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 optical density values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. The obtained optical density of the standards (y-axis, linear) are plotted against their corresponding concentrations (x-axis, logarithmic) either on semi logarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean optical density 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 Calibrator Curve

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

Calibrator	Optical Density (450 nm)
Calibrator 0 (0 pg/ml)	2.869
Calibrator 1 (10 pg/ml)	2.689
Calibrator 2 (30 pg/ml)	2.209
Calibrator 3 (100 pg/ml)	1.353
Calibrator 4 (300 pg/ml)	0.713
Calibrator 5 (1000 pg/ml)	0.338

7 EXPECTED NORMAL VALUES

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 determine its own normal and pathological values and to establish the appropriateness of adopting the reference range suggested here. Samples were collected in the morning.

Age Group (Years)	Men ♂			Women ♀		
	5.-95. Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n	5.-95. 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.-95. 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.

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 kit control values and the corresponding results 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 Diagnostics GmbH directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated by subtracting 2 standard deviations (2SD) from the mean of at least twenty (20) replicate analyses of Calibrator 0. The analytical sensitivity of this assay is 6.1 pg/ml.

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
5 α -Dihydrotestosterone	23.3%
Androstenedione	32.2%
Androsteron	< 0.1%
5 α -Androstane	< 0.1%
5 β -Androstane-3 α ,17 β -diole	< 0.1%
Corticosterone	< 0.1%
11-Desoxycorticosterone	< 0.1%
Dexamethasone	< 0.1%
Estradiol	< 0.1%
Progesterone	< 0.1%
17 α -Hydroxyprogesterone	< 0.1%
Cortisol	< 0.1%
11-Desoxycortisol	< 0.1%
Cortison	< 0.1%
Estrone	< 0.1%
Pregnenolone	< 0.1%
Prednisone	< 0.1%
Prednisolon	< 0.1%
Estriol	< 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 three saliva samples within one run. The within-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/ml)	388.2	41.5	137.3
SD	23.47	3.38	5.89
CV (%)	6.0	8.1	4.3
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of three saliva samples in ten different runs.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/ml)	49.9	88.2	282.7
SD	4.24	6.05	21.38
CV (%)	8.5	6.9	7.6
n =	10	10	10

9.5 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

Sample	Spiking (pg/ml)	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
1	native	50.7	-	-
	100	152.5	150.7	101%
	200	272.9	250.7	109%
	300	361.9	350.7	103%
2	native	15.0	-	-
	100	113.3	115.0	99%
	200	212.6	215.0	99%
	300	301.8	315.0	96%
3	native	82.7	-	-
	100	212.1	182.7	116%
	200	307.6	282.7	109%
	300	406.6	382.7	106%

9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Calibrator 0 and assayed. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and measured values.

Sample	Dilution	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Linearity (%)
1	native	288.5	-	-
	1 : 2	150.6	144.2	104%
	1 : 4	81.7	72.1	113%
	1 : 8	41.5	36.1	115%
2	native	125.2	-	-
	1 : 2	63.8	62.6	102%
	1 : 4	37.5	31.3	120%
	1 : 8	15.4	15.6	98%
3	native	80.7	-	-
	1 : 2	41.1	40.4	102%
	1 : 4	20.2	20.2	100%
	1 : 8	10.5	10.1	104%

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. 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.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay. This can cause false results.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples (17-19). For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this in vitro immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill, etc.) containing testosterone of course will significantly influence the measurement of this analyte. The clinical significance of the determination of testosterone can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids. Any medication should be taken into account when assessing the results.

10.3 High-Dose-Hook Effect

Up to a tested concentration of 20 ng/ml testosterone, no High Dose Hook Effect was observed for the Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA.

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 Diagnostics GmbH.

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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 10-03/17 to actual version 11-05/22

Cover page	Layout change
General	Editorial changes
Chapter 1	Updated intended use and description of the analyte.
Chapter 2	updated; editorial changes
Chapter 3	additional information
Chapter 4	updated and additional information; plate shaker at 900 rpm required (before ≥ 600 rpm) (4.2)
Chapter 5	updated: storage conditions of saliva samples
Chapter 6	updated information (6.1; 6.3); shaking during incubation at 900 rpm (before ≥ 600 rpm) (6.2)
Chapter 9	updated assay characteristics
Chapter 10	additional information, updates, High-Dose-Hook-Effect added (10.3)
Chapter 12	added
Chapter 13	References added

13 REFERENCES

- West C.D 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.
- Butler G.E. et al. (1989): Salivary Testosterone levels and the progress of puberty in the normal boy. *Clin Endocrin* Vol 30, pages 587 – 596
- Osredkar J. et al. (1989): Salivary free testosterone in hirsutism *Ann. Clin. Biochem.* Vol. 26, pages 522 – 526
- Dabbs J.M. et al. (1995): Reliability of salivary testosterone measurements: A Multicenter Evaluation *Clin. Chem.* Vol. 41 (11), pages 1581 – 1584
- Valero-Politi J., Fuentes-Arderiu X. (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
- Rosner W. (2001): An extraordinarily inaccurate assay for free Testosterone is still with us. *J Clin Endocrin Metabol* Vol.86 (6), page 2903
- Miller K.K. 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
- Stanczyk F.Z. et al. (2003): Limitations of direct Estradiol and Testosterone immunoassay kits. *Steroids* Vol. 68, pages 1173 – 1178
- Taieb J. 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
- Sterzer et al. (2015): Intentional updating in episodic memory: Low testosterone associates with enhanced memory updating *Neuroendocrinology Letters* Volume 36, No. 3
- Lewis J.G. (2006): Steroid analysis in saliva: An overview (Review article). *Clin Biochem Rev.* Vol.27, pages 139-146
- Morley J.E. et al. (2006): Validation of salivary Testosterone as a screening test for male hypogonadism. *Aging Male* Vol.9, pages 165-169

13. Rosner W. (2007): Utility, Limitations, and pitfalls in measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement
J Clin Endocrin Metabol Vol. 92 (2), pages 405-413
14. Yasuda M. 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
15. Krebs et al. (2019): Evaluating the four most important salivary sex steroids during male puberty: testosterone best characterizes pubertal development.
J. Pediatr. Endocrinol. Metab 2019; 32(3): 287-294
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
17. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries
Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
18. Tate & Ward (2004): Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
19. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 EINLEITUNG

1.1 Zweckbestimmung

Der Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Testosteron in humanem Speichel.

Dieser Test ist nur für *in-vitro* diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Das Testergebnis muss immer alle klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse berücksichtigen. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein. Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der darüberhinausgehende Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

1.2 Beschreibung des Analyten

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 [9] 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 [13], in dem dringend davor gewarnt wird, mit den zurzeit 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 [8].

Eine direkte Bestimmung des freien Testosterons in Serum- oder Plasmaproben ist mit kommerziellen Assays nicht mit akzeptabler Zuverlässigkeit möglich [6].

Darüber hinaus stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, wie repräsentativ eine Einzelprobe für die Analytik der Steroide ist. Dazu wurden bereits vor drei 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 [1]. 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.

Die Messung von Testosteron wird bei der unterstützenden Diagnose von Störungen der männlichen Geschlechtshormone (Androgene) eingesetzt, darunter primärer und sekundärer Hypogonadismus, Impotenz bei Männern und Hirsutismus (übermäßige Behaarung) und Virilisierung (Vermännlichung) bei Frauen aufgrund von polyzystischen Ovarien und adrenogenitalen Syndromen. Die Bestimmung von Testosteron im Speichel ermöglicht eine gute nicht-invasive Charakterisierung von pubertären Entwicklungsstadien [15].

2 TESTPRINZIP

Der Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay (ELISA), der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Eine unbekannte Menge an Antigen in der Probe und das enzymmarkierte Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Wells der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes (enzymmarkiertes) Antigen durch Waschen entfernt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Nach Zugabe der Substratlösung ist die Intensität der Farbentwicklung umgekehrt proportional zur Konzentration von Testosteron in der Probe. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung gestoppt und die Optische Dichte (OD) gemessen. Es wird eine Standardkurve erstellt, indem die OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards aufgetragen werden. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieses Kit ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Für jedes Reagenz ein separates Gefäß verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn das Gefäß der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Optischen Dichte.
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe 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 in der Packungsbeilage 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 austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um dieselbe Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder transportiert worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen können.
16. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
17. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
18. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
19. 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. Sie finden diese auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen.
20. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; mit anti-Testosteron-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper) beschichtet.
2. **CAL 0 Standard 0**, 1 Fläschchen, 3 ml, gebrauchsfertig.
3. **CAL 1-5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig; enthalten definierte Menge von Testosteron in Pufferlösung.
Konzentrationen: 10 – 30 – 100 – 300 – 1000 pg/ml
Umrechnungsfaktor: Testosteron (pg/ml) x 3.47 = pmol/l.
4. **CONTROL 1-2 Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 1 ml; gebrauchsfertig; enthalten definierte Menge von Testosteron in Pufferlösung
Kontrollwerte und –bereiche sind dem QC-Datenblatt zu entnehmen.
5. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 12 ml, gebrauchsfertig; Testosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert; enthält <0.01% CMIT/MIT und <0.02% MIT.
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure.
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung, 10X** konzentriert, 1 Fläschchen, 50 ml;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4) .

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 nm-Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Deionisiertes Wasser
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung
- Vortex-Mixer
- Mikrozentrifuge

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. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen.

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 (18-25°C) 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 (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur (18-25°C) wieder auflösen sollten. Die Waschlösung darf erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

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 Diagnostics GmbH 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 ultrareinem Polypropylen zu verwenden. PE-enhaltende Behältnisse sind zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Keine Salivetten zur Probensammlung verwenden. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet, allerdings muss darauf geachtet werden, dass verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigen, welche bei PE-Stopfen aber zu erwarten sind.

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 zwei Stunden fünf 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. Da die Testosteron-Konzentration bei Männern am frühen Morgen deutlich erhöht ist und nach dem Erwachen steil abfällt, sollte dieses bei der Probenentnahme 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

Eine Aufbewahrung der Speichelproben kann bis zu einer Woche vorgenommen werden. Für eine längere Aufbewahrung müssen die Proben bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen nicht bedenklich, aber möglichst zu vermeiden 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 fünf bis zehn 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 können zu falschen Ergebnissen führen. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die fünf 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.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) 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 Wells 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.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten mindestens in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **100 µl Standards, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µl Enzymkonjugat** in jedes Wells geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubieren (900 rpm).
Achtung: Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütten. Wells **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 (18-25°C) ohne Schütteln im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 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. Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier oder mit einer automatisierten Methode auswerten.
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:

Testosteron (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 (450 nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	2,869
Standard 1 (10 pg/ml)	2,689
Standard 2 (30 pg/ml)	2,209
Standard 3 (100 pg/ml)	1,353
Standard 4 (300 pg/ml)	0,713
Standard 5 (1000 pg/ml)	0,338

7 ERWARTETE WERTE

Aufgrund der Unterschiede, die zwischen den einzelnen Laboratorien und Standorten in Bezug auf die Bevölkerung, die Labortechnik und die Auswahl der Referenzgruppe bestehen können, ist es wichtig, dass jedes Labor seine eigenen normalen und pathologischen Werte bestimmt und feststellt, ob die Übernahme des hier vorgeschlagenen Referenzbereichs angemessen ist. Die Proben wurden morgens entnommen.

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

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Testosteronwerte im Speichel zeigen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

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 Kit-Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen 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 Tests 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 Diagnostics GmbH in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde durch Subtraktion von 2 Standardabweichungen (2SD) vom Mittelwert von mindestens zwanzig (20) Wiederholungsanalysen von Standard 0 berechnet. Die analytische Sensitivität dieses Tests beträgt 6,1 pg/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Substanzen wurden auf ihre Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50 % Verdrängung im Vergleich zu Testosteron an.

Steroid	% Kreuzreaktivität
5 α -Dihydrotestosteron	23,3%
Androstenedion	32,2%
Androsteron	< 0,1%
5 α -Androstan	< 0,1%
5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol	< 0,1%
Corticosteron	< 0,1%
11-Desoxycorticosteron	< 0,1%
Dexamethason	< 0,1%
Estradiol	< 0,1%
Progesteron	< 0,1%
17 α -Hydroxyprogesteron	< 0,1%
Cortisol	< 0,1%
11-Desoxycortisol	< 0,1%
Cortison	< 0,1%
Estron	< 0,1%
Pregnenolon	< 0,1%
Prednison	< 0,1%
Prednisolon	< 0,1%
Estriol	< 0,1%
Danazol	< 0,1%

9.3 Messbereich

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

9.4 Präzision

9.4.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde ermittelt durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von drei Speichelproben in einem Testansatz. Die Variation innerhalb des Tests ist nachfolgend dargestellt:

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (pg/ml)	388,2	41,5	137,3
SD	23,47	3,38	5,89
CV (%)	6,0	8,1	4,3
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelbestimmungen von drei Speichelproben in zehn verschiedenen Tests bestimmt.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (pg/ml)	49,9	88,2	282,7
SD	4,24	6,05	21,38
CV (%)	8,5	6,9	7,6
n =	10	10	10

9.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Proben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Ergebnisse der Proben ermittelt.

Probe	Zugefügtes Testosteron (pg/ml)	Gemessener Wert (pg/ml)	Erwarteter Wert (pg/ml)	Wiederfindung (%)
1	nativ	50,7	-	-
	100	152,5	150,7	101%
	200	272,9	250,7	109%
	300	361,9	350,7	103%
2	nativ	15,0	-	-
	100	113,3	115,0	99%
	200	212,6	215,0	99%
	300	301,8	315,0	96%
3	nativ	82,7	-	-
	100	212,1	182,7	116%
	200	307,6	282,7	109%
	300	406,6	382,7	106%

9.6 Linearität

Drei Speichelproben mit verschiedenen Mengen des Analyten wurden mit dem Standard 0 seriell verdünnt und untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Werte berechnet.

Probe	Verdünnung	Gemessener Wert (pg/ml)	Erwarteter Wert (pg/ml)	Linearität (%)
1	nativ	288,5	-	-
	1 : 2	150,6	144,2	104%
	1 : 4	81,7	72,1	113%
	1 : 8	41,5	36,1	115%
2	nativ	125,2	-	-
	1 : 2	63,8	62,6	102%
	1 : 4	37,5	31,3	120%
	1 : 8	15,4	15,6	98%
3	nativ	80,7	-	-
	1 : 2	41,1	40,4	102%
	1 : 4	20,2	20,2	100%
	1 : 8	10,5	10,1	104%

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit Verständnis der Packungsbeilage und unter Einhaltung der Guten Laborpraxis durchgeführt wird. 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. Im Falle einer sichtbaren Blut-Kontamination sollte der Patient die Probe verwerfen, das Probenentnahmegesäß mit Wasser spülen, 10 Minuten abwarten und eine erneute Probenentnahme durchführen.
- Natriumazid darf nicht in diesem Assay eingesetzt werden. In dem Fall kann es zu falschen Ergebnissen führen.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden (17-19). Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Tests führen. Daher können Interferenzen mit diesem *In-vitro*-Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Tests betrachtet werden.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die Testosteron enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten. Die klinische Bedeutung der Bestimmung von Testosteron kann beeinflusst werden, wenn der Patient mit natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt wurde. Jede Medikation muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Bis zu einer getesteten Konzentration von 20 ng/ml Testosteron wurde für den Demeditec Testosterone free in Saliva ELISA kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet.

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 Diagnostics GmbH 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 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 10-03/17 zur aktuellen Version 11-05/22

Deckblatt	Layout aktualisiert
Allgemein	Redaktionelle Änderungen
Kapitel 1	Aktualisierung der Zweckbestimmung und der Beschreibung des Analyten
Kapitel 2	Aktualisierung; redaktionelle Änderung
Kapitel 3	zusätzliche Informationen
Kapitel 4	Aktualisierung und zusätzliche Angaben; Mikrotiterplatten-Schüttler bei 900 rpm benötigt (vorher ≥ 600 rpm) (4.2)
Kapitel 5	Aktualisierung: Lagerbedingung von Speichelproben
Kapitel 6	aktualisierte und zusätzliche Informationen (6.1; 6.3); Schütteln während der Inkubation bei 900 rpm (zuvor ≥ 600 rpm) (6.2)
Kapitel 9	aktualisierte Testspezifikationen
Kapitel 10	zusätzliche Informationen, Aktualisierungen, High-Dose-Hook-Effekt hinzugefügt (10.3)
Kapitel 12	hinzugefügt
Kapitel 13	Literatur hinzugefügt

13 REFERENZEN

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

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