



User's Manual



Salivary Testosterone ELISA

IVD

REF

SLV-3013



96 Wells



Legal Manufacturer:

DRG

DRG Instruments GmbH, Germany

Division of DRG International, Inc

Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: www.drg-diagnostics.de

E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenido

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION...	5
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF USE.....	10
11	LEGAL ASPECTS	11
12	REFERENCES / LITERATURE.....	11

1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG.....	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
7	ERWARTETE WERTE	16
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	16
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
10	GRENZEN DES TESTS	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN / LITERATUR	18

1	INTRODUCCIÓN.....	19
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	19
3	PRECAUCIONES	19
4	COMPONENTES DEL KIT	20
5	MUESTRAS.....	21
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	22
7	VALORES ESPERADOS	23
8	CONTROL DE CALIDAD.....	23
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	24
10	LIMITACIONES DE USO.....	24
11	ASPECTOS LEGALES.....	25
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	25

	SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS	26
--	------------------------------------	----

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

An Enzyme Immunoassay for the *in vitro diagnostic* 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

Testosterone (17 β -hydroxy-4-androstene-3-one) is a C19 steroid with an unsaturated bond between C-4 and C-5, a ketone group in C-3 and a hydroxyl group in the β position at C-17. This steroid hormone has a molecular weight of 288.4 daltons. Testosterone is the most important androgen secreted into the blood. In males, primarily the Leydig cells of the testis secrete testosterone; in females approximately 50% of circulating testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione, approximately 25% from the ovary and 25% from the adrenal glands.

Testosterone is responsible for the development of secondary male sex characteristics and its measurements are helpful in evaluating the hypogonadal status (1-4). In women high levels of testosterone are generally found in hirsutism and virilisation, polycystic ovaries, ovarian tumors, adrenal tumors and adrenal hyperplasia (5-7). In men high levels of testosterone are associated with hypothalamic-pituitary-unit dysfunction, testicular tumors, congenital adrenal hyperplasia and prostate cancer. Low levels of testosterone are encountered in male patients with the following diseases:

Klinefelter's syndrome. Hypopituitarism, testicular feminization, orchidectomy, cryptorchidism, enzymatic defects and some autoimmune diseases (8).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Salivary Testosterone ELISA** Kit is based on the competition principle and the microplate separation. An unknown amount of free testosterone present in the sample and a fixed amount of testosterone conjugated with horseradish peroxidase compete for the binding sites of mouse monoclonal testosterone antiserum coated onto the wells. After one-hour incubation the microplate is washed to stop the competition reaction. 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. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. 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.
4. 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.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. 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.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. 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.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. 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.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin, BND and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with a anti-Testosterone antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL each, ready to use;
Concentrations: 0.0 – 10 – 50 – 100 – 500 – 1000 – 5000 pg/mL
Conversion: Testosterone (pg/mL) x 3.47 = pmol/L
* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservative.
3. **Control**, 2 vials, 1.0 mL each, ready to use;
Control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 26 mL, ready to use;
Testosterone conjugated to horseradish peroxidase;
* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
contains 0.5M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 ml (40X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
- MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

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

4.2 Materials required but not provided

1. Calibrated EIA reader adjusted to read at 450 nm
2. Precision pipettes (100 µL and 200 µL)
3. Distilled or Deionized water
4. Timer (60 min. range)
5. Reservoirs (disposable)
6. Test tube or microtube rack in a microplate configuration
7. Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two month if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution:

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

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 to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, 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 COLLECTION AND PREPARATION

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

If there is visible blood contamination the patient specimen, it should be discarded, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected only using special saliva sampling devices (e.g. SALI TUBES 100 [REF](#) SLV-4158, available from DRG).

Do not use Salivettes for sampling.

Due to the cyclic secretion pattern of steroid hormones it is important to care for a proper timing of the sampling.

In order to avoid arbitrary results we recommend that 5 samples always be taken within a period of 2 – 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal.

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.

5.2 Specimen Storage and Preparation

The saliva samples may be stored at 2 °C to 8 °C up to one week, and should be frozen at –20 °C for longer periods; repeated thawing and freezing is no problem.

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once in order to separate the mucins by centrifugation.

Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully.

Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes (at 3000 - 2000 x g).

Now the clear colorless supernatant is easy to pipette.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) Dilution 1:10: 10 µl saliva + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)

b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µL *Standard 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.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each Testosterone **Standard** and **Control** into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL** of each **sample** into selected wells.
4. Dispense **200 µL** of **Enzyme Conjugate** into each sample and standard well and mix the plate for thoroughly for 10 seconds.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells and rinse the wells **3 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the inverted wells sharply on absorbent paper towel to remove residual droplets.
7. Add **200 µL** of **Substrate Solution** (4) to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** (5) to each well.
10. Determine the absorbance of each well at 450 ± 10 nm.
It is recommended to read the wells within 10 minutes.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear – log graph paper, Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard 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 standard have to be further diluted or reported as > 5000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Conversion:

Testosterone (pg/mL) x 3.47 = pmol/L

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2.01
Standard 1 (10 pg/mL)	1.89
Standard 2 (50 pg/mL)	1.57
Standard 3 (100 pg/mL)	1.36
Standard 4 (500 pg/mL)	0.69
Standard 5 (1000 pg/mL)	0.43
Standard 6 (5000 pg/mL)	0.13

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of SLV Testosterone, saliva samples from 187 adult male and 188 adult female apparently healthy subjects, ages 21 to 75 years, were collected in the morning and analyzed using the DRG SLV Testosterone ELISA kit. The following range was calculated from this study.

Age Group Years	Men ♂			Women ♀		
	Range (5 - 95%)	Median	n	Range (5 - 95%)	Median	n
21 - 30	47.2 – 136.2	92.8	42	7.9 – 50.4	20.8	40
31 - 40	46.8 – 106.8	73.6	37	<7.0 – 44.8	17.1	40
41 - 50	36.5 – 82.7	58.8	34	<7.0 – 39.4	18.3	38
51 - 60	19.1 – 89.0	44.5	36	<7.0 – 29.8	19.2	38
61 - 75	12.2 – 68.6	38.9	38	<7.0 – 29.3	16.0	32

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 be obtained the same hour each day. Furthermore, we recommend that each laboratory determine its own range for the population tested.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls 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 state and federal 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 on 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 analysing 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 DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 1.9 – 5000 pg/mL.

9.2 Specificity

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 α -Dihydrotestosterone	0.80
Androstenedione	0.90
11 β -hydroxysterone	3.30
17 α -methyltestosterone	0.10
19-Nortestosterone	3.30
Epitestosterone	0.10
Estradiol	0.10
Progesterone	< 0.10
Cortisol	< 0.10
Estrone	< 0.10
Danazol	< 0.10

9.3 Sensitivity

The lowest analytical detectable level of testosterone that can be distinguished from the Zero Standard is 1.9 pg/mL at the 95 % confidence limit.

The lowest functional sensitivity of 7.1 pg/mL at the 95% confidence limit was obtained.

9.4 Reproducibility

Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 5 saliva samples within one run. The within-assay variability is shown below:

Mean (pg/mL)	144.0	256.2	81.3	35.4	12.9
SD	9.0	17.6	5.5	2.5	1.8
CV (%)	6.2	6.9	6.8	7.1	13.8
n =	20	20	20	20	20

Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of 5 saliva samples over 10 days.

Mean (pg/mL)	823.1	87.6	118.8	112.1	33.6
SD	45.3	6.9	8.9	8.6	3.2
CV (%)	5.5	7.8	7.5	7.7	9.6
n =	20	20	20	20	20

Inter-Lot

The Inter-Lot (between-lot) variation was determined by triplicate measurements of five saliva samples in three different kit lots. The between lot variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Mean (pg/mL)	64.5	352.9	517.7	44.0	116.5
SD (pg/mL)	3.8	13.4	15.0	1.5	5.0
CV (%)	5.9	3.8	2.9	3.5	4.3
n =	9	9	9	9	9

9.5 Recovery

Recovery of the DRG ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to six different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (native and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples

Sample	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)	Sample	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
1	8.4	-	-	4	210	-	-
	2396.9	2508.4	95.6		2650	2710	97.8
	517.2	508.4	101.7		700	710	98.6
	271.1	258.4	104.9		240	240	100.0
	56.0	58.4	95.82				
2	46.2	-	-	5	1250	-	-
	2474.7	2546.2	97.2		3700	3750	98.7
	564.4	546.2	103.3		1680	1750	96.0
	309.0	296.2	104.3		1250	1280	97.7
	88.9	96.2	92.4				
3	122.1	-	-	6	2090	-	-
	2602.4	2622.1	99.3		4550	4590	99.1
	591.2	622.1	95.0		2650	2590	102.3
	352.6	372.1	94.8		2130	2120	100.5
	166.4	172.1	96.7				

9.6 Linearity

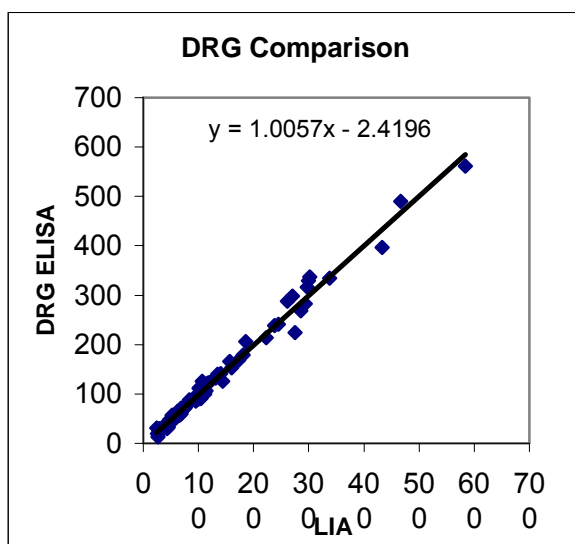
Six saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with zero standard and assayed with the DRG ELISA. Three native samples were serially diluted, and 3 samples were spiked with testosterone and then serially diluted up to 1:128. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for testosterone. An assay linearity of 7.1 – 4500 pg/mL has been identified as the usable range. Samples above this range must be diluted and re-run.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Concentration (pg/mL)	4312	1838	440	8000	4500	5500
Average % Recovery	97.5	99.6	98.9	100.3	100.8	100.7
Range of Recovery %						
from	96.3	98.4	93.6	93.6	93.7	94.1
to	98.7	101.0	106.7	106.7	107.0	107.8

9.7 Comparison Studies

A study was performed that evaluated saliva samples from 99 male and female subjects ages 20 to 70 years. The saliva samples were run in duplicate on the DRG test and a commercially available LIA method to determine the concentration of free Testosterone in the samples. A correlation of 0.904 and regression formula of $y = 0.9251x - 7.4369$ was obtained versus this method.

Another study was performed to further evaluate the substantial equivalence of the DRG SLV Testosterone to the LIA saliva test. The concentration of testosterone in 81 additional saliva samples collected from 40 - 65 year old men and women was determined using DRG SLV testosterone kit and the other method. From this study an $R^2 = 0.9866$ was obtained with the following regression.



10 LIMITATIONS OF USE

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.

The patient should not eat, drink, chew gum or brush teeth for 30 minutes before sampling. Otherwise rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination)

10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.16 % in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye.

Concentrations of Sodium Azide ≥ 0.02 % interferes in this assay and may lead to false results.

10.2 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.

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 DRG.

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 / LITERATURE

1. Mulhall JP, et al. (2004); Effect of testosterone supplementation on sexual function in hypogonadal men with erectile dysfunction, *Urology* 63, 348-352
2. Grinspoon S., et al. (2000); Effects of hypogonadism and testosterone administration on depression indices in HIV-infected men, *J Clin. Endocrinol Metab.* 85, 60-65
3. Leder BZ, et al. (2004); Effect of aromatase inhibition in elderly men with low or borderline-low serum testosterone levels, *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 1174-1180
4. Bunch T., et al. (2002); Pituitary radiographic abnormalities and clinical correlates of hypogonadism in elderly males presenting with erectile dysfunction, *Aging Male.* 5, 38-46
5. Ruutiainen K., et al. (1987); Salivary testosterone in hirsutism: correlations with serum testosterone and the degree of hair growth, *J Clin Endocrinol Metab.* 64, 1015-1020
6. Cserepes E., et al. (2002); Ovarian steroid cell tumor and a contralateral Ovarian thecoma in a postmenopausal woman with severe hyperandrogenism, *Gynecol Endocrinol.* 16, 213-216
7. Baldwin L. J., et al; (2004); Virilisation in a case of transitional cell carcinoma of the ovary, *J Clin Pathol.* 57, 1331-1332
8. Blumberg J., et al. (1991); Testicular tumors in congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins, *J Clin Endocrinol Metab.* 73, 1129-1133

1 EINLEITUNG

Der **DRG Salivary Testosterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Testosteron in Speichel eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG Salivary Testosterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Testosteron-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Testosteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Testosteron aus der Probe mit dem Testosteron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells 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 Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. 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 Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Material Sicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-Testosteron-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
 2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0.0 – 10 – 50 – 100 – 500 – 1000 – 5000 pg/mL
Umrechnungsfaktor: Testosteron (pg/mL) x 3.47 = pmol/L
* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
 3. **Control** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1,0 mL; gebrauchsfertig
* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
 4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 26 mL, gebrauchsfertig; Testosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
 5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
 6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H₂SO₄.
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
 7. **Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

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

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette (100 µL, 200 µL)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.2 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.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

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

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 ml) mit 1170 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 ml verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG 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

Speichelproben werden in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

Der Patient sollte vor der Probenahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Salivaproben können in speziellen Sammelgefäßen gesammelt werden:

z.B. SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158), erhältlich bei DRG .

Bitte verwenden sie keine Salivetten.

Da die Steroidhormone ein deutliches zyklisches Sekretionsmuster zeigen, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten.

Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

Da Lebensmittel eine bedeutende Menge an Steroidhormonen enthalten können, sollten die Proben möglichst nüchtern entnommen werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Sammelperiode auf jeden Fall vor einer Mahlzeit liegen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei –20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

Um Muzine aus der Probe zu entfernen, muss jede Probe mindestens einmal eingefroren und aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden.

Nach der Ankunft im Labor muss eine Probe mindestens über Nacht tiefgekühlt gelagert werden. Am nächsten Morgen wird die eingefrorene Probe auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Dann muss die Probe 5 bis 10 Minuten zentrifugiert werden (bei 3000 – 2000 x g).

Der klare, farblose Überstand kann jetzt einfach pipettiert werden.

Wird ein solches Set an Mehrfach-Proben getestet (nach mindestens einem Einfrier- Auftau- und Zentrifugationszyklus) muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine Mischprobe aus Aliquots aller 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

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 Speichel + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 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 eine neue Plastikspitze verwenden, 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.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standards**, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **200 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen.
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls 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, 4 Parameter Rodbard) bestimmt.
Andere Auswertungsfunktionen können leicht 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.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2,01
Standard 1 (10 pg/mL)	1,89
Standard 2 (50 pg/mL)	1,57
Standard 3 (100 pg/mL)	1,36
Standard 4 (500 pg/mL)	0,69
Standard 5 (1000 pg/mL)	0,43
Standard 6 (5000 pg/mL)	0,13

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Speichelproben von 187 Männern und 188 Frauen (gesunde Individuen), im Alter von 21 bis 75 Jahren, untersucht. Die Proben wurden morgens gesammelt.

Dabei ergaben sich mit dem DRG Salivary Testosterone ELISA folgende Werte:

Alter (Jahre)	Männer			Frauen		
	Bereich [pg/mL] (5 - 95%)	Median [pg/mL]	n	Bereich [pg/mL] (5 - 95%)	Median [pg/mL]	n
21 - 30	47.2 – 136.2	92.8	42	7.9 – 50.4	20.8	40
31 - 40	46.8 – 106.8	73.6	37	<7.0 – 44.8	17.1	40
41 - 50	36.5 – 82.7	58.8	34	<7.0 – 39.4	18.3	38
51 - 60	19.1 – 89.0	44.5	36	<7.0 – 29.8	19.2	38
61 - 75	12.2 – 68.6	38.9	38	<7.0 – 29.3	16.0	32

Testosteronwerte im Speichel zeigen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden.

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 normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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 DRG in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 1.9 – 5000 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 1,9 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 von mehr als 0,16 % 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

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Testosteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

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 DRG 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 / LITERATUR

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

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Testosterone** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Testosterona en saliva.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Testosterone ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula Testosterona. En las muestras de los pacientes Testosterona compite con un conjugado Testosterona -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Testosterona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Testosterona en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.
Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de las guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-Testosterona (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, (*Estándar*), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0.0 – 10 – 50 – 100 – 500 – 1000 – 5000 pg/mL
Conversión: Testosterona (pg/mL) x 3.47 = pmol/L
* Contiene 0.03% Proclin 300, 0.015% BND y 0.010% MIT como conservante.
3. **Control**, 2 viales, 1,0 mL, listo para usar;
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
* Contiene 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT como conservante.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 26 mL, listo para usar, Testosterona conjugado con la Peroxidasa de rábano;;
* Contiene 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT como conservante.
5. **Substrate Solution** (*Solución de sustrato*), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (*Solución de parada*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5M H₂SO₄,
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **Wash Solution** (*Solución de lavado*), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bromonitrodioxano)
- MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (Metilisotiazolona)

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2-8°C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2-8°C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2-8°C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. *La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.*

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra.

No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca .

Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

Nota: No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Las muestras de saliva han de ser recogidas solamente utilizando aparatos especiales para recogida de muestras de saliva (vial y pajita), ej. SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158).

No utilizar Salivette (hisopo de algodón) para recogida de muestra.

Debido al patrón de secreción cíclica de las hormonas esteroideas, es importante preocuparse por una recogida coordinada.

Para evitar resultados arbitrarios recomendamos la recogida de 5 muestras siempre en un período de 2-3 horas (recogida múltiple) preferentemente antes de una comida.

Debido a que la comida puede contener una cantidad significativa de hormonas esteroideas, las muestras han de recogerse preferentemente en ayuno. Si el ayuno fuera un problema, el período de recogida debe ser coordinado justo antes de comer o de cenar.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras de saliva han de almacenarse entre 2-8°C hasta una semana, y deben congelarse a -20°C para períodos superiores; no es un problema el descongelado y congelado repetido.

Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación.

Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calientan hasta temperatura ambiente y se mezclan cuidadosamente.

Entonces, las muestras han de ser centrifugadas de 5 a 10 minutos (a 3000 - 2000 x g).

Ahora el sobrenadante incoloro es fácil de pipetear.

Si se ha de ensayar un conjunto de múltiples muestras, se han de mezclar (al menos con un ciclo de congelado, descongelado y centrifugación) una mezcla de 5 muestras a parte y realizar el ensayo de esta mezcla.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL saliva + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **100 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **200 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Nota importante:

La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Adicionar **200 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2.01
Standard 1 (10 pg/mL)	1.89
Standard 2 (50 pg/mL)	1.57
Standard 3 (100 pg/mL)	1.36
Standard 4 (500 pg/mL)	0.69
Standard 5 (1000 pg/mL)	0.43
Standard 6 (5000 pg/mL)	0.13

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DRG Testosterone ELISA se observaron los siguientes valores:

Edad (años)	Hombres ♂			Mujeres ♀		
	Rango (5 - 95%)	Median	n	Rango (5 - 95%)	Median	n
21 - 30	47.2 - 136.2	92.8	42	7.9 - 50.4	20.8	40
31 - 40	46.8 - 106.8	73.6	37	< 7.0 - 44.8	17.1	40
41 - 50	36.5 - 82.7	58.8	34	< 7.0 - 39.4	18.3	38
51 - 60	19.1 - 89.0	44.5	36	< 7.0 - 29.8	19.2	38
61 - 75	12.2 - 68.6	38.9	38	< 7.0 - 29.3	16.0	32

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 1.9 – 5000 pg/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 1,9 pg/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

Para la obtención de resultados fiables y reproducibles en el desarrollo del ensayo es necesario un conocimiento completo de las instrucciones del interior del paquete y de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Una contaminación con sangre de más de 0,16 % en las muestras de saliva afectará los resultados, y puede verse normalmente a simple vista.

Las concentraciones de acida sódica $\geq 0,02$ % interfieren en el ensayo y pueden conducir a falsos resultados.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Testosterona en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	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	Usage Diagnostique in vitro	Para uso 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
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	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
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante