



TESTOSTERONE-ELISA

KAPD1559



History

Summary of change :

Previous Version : 200422/1	Current Version : 210527
6.2 Test procedure 4. Incubate for 60 minutes at room temperature (without covering the plate).	6.2 Test procedure 4. Incubate for 60 minutes at room temperature.



TESTOSTERONE ELISA

en

KAPD1559

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 91 90

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The DIAsource Testosterone ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Testosterone in serum and plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

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 288.47.

Testosterone is the most important androgen secreted into the blood. In males, testosterone is secreted primarily by the Leydig cells of the testes; in females ca. 50% of circulating testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione, ca. 25% from the ovary and ca. 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 states.

In women, high levels of testosterone are generally found in hirsutism and virilization, polycystic ovaries, ovarian tumors, adrenal tumors and adrenal hyperplasia.

In men, high levels of testosterone are associated to the hypothalamic pituitary unit diseases, testicular tumors, congenital adrenal hyperplasia and prostate cancer.

Low levels of testosterone can be found in patients with the following diseases: Hypopituitarism, Klinefelter's syndrome, Testicular feminization, Orchidectomy and Cryptorchidism, enzymatic defects and some autoimmune diseases.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DIAsource Testosterone ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards an unique antigenic site on the Testosterone molecule. During the first incubation, the testosterone in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is testosterone conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

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. 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 300, BND and/or 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 DIIsource.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1.  **Microtiterplate**, 12 x 8 (break apart) strips
96 wells
Wells coated with a mouse monoclonal anti-Testosterone antibody
2.

CAL	N
-----	---

 N=0 to 6
7 vials, 1 ml, ready to use
Concentrations : 0 - 0.2 - 0.5 - 1 - 2 - 6 - 16 ng/mL
Conversion : 1 ng/mL = 3.467 nmol/L
Contain non-mercury preservative.
3.

Ag	HRP
----	-----

 Enzyme Conjugate
1 vial, 25 mL - ready to use
Testosterone conjugated to horseradish peroxidase
* Contain non-mercury preservative.
4.

CHROM	TMB
-------	-----

 1 vial, 25 ml
Ready to use
Tetramethylbenzidine (TMB)
5.

STOP	SOLN
------	------

 1 vial, 14 ml
Ready to use
Contains 0.5M H₂SO₄
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns
6.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 1 vial, 30 ml (40X concentrated)
see "Reagent preparation"

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

4.2 Materials required but not included

1. A microtiter plate calibrated reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
2. Calibrated variable precision micropipettes.
3. Absorbent paper.
4. Distilled water
5. Timer
6. 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 - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent preparation

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature (20°C to 26°C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL distilled 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 Sheets.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DIAsource 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

Serum or plasma (EDTA-, Heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter 10.1. *Interfering Substances*.

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

5.1 Specimen collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant and centrifuged immediately after collection. (E.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation)

5.2 Specimen storage and preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2-8°C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain testosterone more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and reassayed 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 Serum + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, 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 calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Calibrator**, **Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **200 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted Wash Solution per well, if a plate washer is used.
- OR -
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted Wash Solution per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading)** and at **620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

6.3 Calculation of the results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4-Parameter Rodbard or 4-Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted or reported as > 16 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Calibration Curve

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

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/mL)	2.1
Calibrator 1 (0.2 ng/mL)	1.71
Calibrator 2 (0.5 ng/mL)	1.44
Calibrator 3 (1 ng/mL)	1.18
Calibrator 4 (2 ng/mL)	0.89
Calibrator 5 (6 ng/mL)	0.46
Calibrator 6 (16 ng/mL)	0.24

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DIAsource Testosterone ELISA the following values are observed:

Population	5% Percentile	95% Percentile
Males	2.0 ng/mL	6.9 ng/mL
Females	0.26 ng/mL	1.22 ng/mL

The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

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 DIAsource directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.083 – 16 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Analyte	Cross Reactivity (%)
Testosterone	100.0
DHT	12.9
5 α -Dihydrotestosterone	0.8
Androstenedione	0.9
11 β -Hydroxytestosterone	3.3
17 α -Methyltestosterone	0.1
19-Nortestosterone	3.3
DHEA	0.3
DHEA-S	<0.1
Epitestosterone	< 0.1
Progesterone	< 0.1
Cortisol	< 0.1
Estrone	< 0.1
Estradiol	< 0.1
Estriol	< 0.1
Danazol	< 0.1

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DIAsource ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Zero Calibrator and was found to be 0.083 ng/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	0.7	4.2
2	20	4.9	3.3
3	20	11.3	3.3

9.4.2 Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	12	0.8	9.9
2	12	5.2	6.7
3	12	11.4	4.7

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Testosterone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.

The expected values were calculated by addition of half of the values determined for the undiluted samples and half of the values of the known solutions. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements values and the expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)	1.1	6.1	11.6
Average Recovery (%)	109.2	100.5	109.1
Range of Recovery (%)	from	86.9	92.2
	to	110.7	110.1

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)	1.1	6.1	11.3
Average Recovery (%)	95.5	101.5	104.9
Range of Recovery (%)	from	86.1	89.0
	to	106.6	110.6

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.

10.1 Interfering substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.25 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Testosterone in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

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 calibrators 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 DIASource.

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. Smith LB and Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014, 30, 2-13.
2. Zirkin BR and Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(1), 101–111.
3. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol.* 2016, 230, R13-25.
4. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-Induced Ca(2+) signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013,4, 127.
5. Santi D et al. Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *J Clin Med.* 2020, 9(4), 1014, 1-28.
6. Livingston M, Kalansooriya A and Hartland AJ. Serum testosterone levels in male hypogonadism: Why and when to check—A review. *Int J Clin Pract.* 2017, 71(11) 1-9.
7. Semet M et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.* 2017, 5(4), 640-663.
8. Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet.* 2014, 383, 1250-63.
9. Rodprasert W et al. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front Endocrinol.* 2020, 10, (906), 1-27.
10. Bode D, Seehusen DA, and Baird D. Hirsutism in women. *Am Fam Physician.* 2012,85(4), 373-80.
11. Soman M et al. Serum androgen profiles in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 2018, 26, 78-93.

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

Revision date : 27-05-2021



TESTOSTERONE ELISA

es

KAPD1559

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 91 90

1 INTRODUCCIÓN

El Kit de inmunoensayo enzimático DIAsource Testosterone proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del testosterona en suero o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma citrado).

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico in vitro.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DIAsource Testosterone ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción 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 compete con un conjugado testosterona-peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado.


Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Se construye una curva estándar trazando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí 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 DIAsource ImmunoAssays S.A.
Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de la guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

-  **Microtiterplates** (*Placas multipocillo*), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-Testosterona (monoclonal).
- | | |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

Calibrador (Calibrador 0-6), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 – 0,2 – 0,5 – 1 – 2 – 6 – 16 ng/mL
Conversión: 1 ng/mL = 3,467 nmol/L
Contiene conservante sin mercurio.
- | | |
|----|-----|
| Ag | HRP |
|----|-----|

Enzyme Conjugate (*Conjugado enzimático*), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Testosterona conjugado con la Peroxidasa de rábano;;
Contiene conservante sin mercurio.
- | | |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

Substrate Solution (*Solución de sustrato*), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
- | | |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

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 al piel.
- | | | |
|------|------|------|
| WASH | SOLN | CONC |
|------|------|------|

Wash Solution (*Solución de lavado*), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

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

4.1 EQUIPAMIENTO Y MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROVISTO

Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm).
Micropipetas de precisión variable calibradas.
Papel absorbente.
Agua destilada.

4.2 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.

4.3 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

Wash Solution

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

4.4 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.

4.5 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 DIAsource ImmunoAssays S.A., no mas 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

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato).

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "Sustancias que pueden interferir".

5.1 TOMA DE MUESTRAS

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2-8°C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el calibrador mas concentrado, ha de diluirse con *Calibrador 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 Suero + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Calibrador 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 calibrador, 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 calibradores.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada *Calibrador*, *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. Lavar los pocillos **3 veces** con **400 µL** Wash Solution diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas.

- O -

Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.

Lavar los pocillos **3 veces** con **300 µL** Wash Solution diluida por pocillo para el lavado manual.

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 **15 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura)** y a **620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

6.3 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva calibrador mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada calibrador 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 calibrador.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de calibradores. Las muestras con concentraciones superiores al mayor calibrador han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo típico de una curva calibrador

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

Calibrador	Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	2,1
Calibrador 1 (0,2 ng/mL)	1,71
Calibrador 2 (0,5 ng/mL)	1,44
Calibrador 3 (1 ng/mL)	1,18
Calibrador 4 (2 ng/mL)	0,89
Calibrador 5 (6 ng/mL)	0,46
Calibrador 6 (16 ng/mL)	0,24

7 VALORES ESPERADOS

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

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

Población	Percentil 5%	Percentil 95%
Hombres	2,0 ng/mL	6,9 ng/mL
Mujeres	0,26 ng/mL	1,22 ng/mL

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 DIAsource ImmunoAssays S.A. directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 RANGO DINÁMICO DEL ENSAYO

El rango del ensayo se encuentra entre 0,083 – 16 ng/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 calibrador de veinte (20) réplicas del *calibrador 0* y resultó ser 0,083 ng/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.

10.1 SUSTANCIAS QUE PUEDEN INTERFERIR

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,25 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

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 calibradores 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 DIAsource ImmunoAssays S.A.

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.

Fecha de revisión: 27-05-2021