

Testosterone



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of total Testosterone in human serum or plasma

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Testosterona total en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Espanol:	Página	8 a 13

Bibliography/ Bibliografía	Page / Página	14
----------------------------	---------------	----

Symbols Key / Símbolos	Page/ Página	15
------------------------	--------------	----

Summary of Test Procedure/ Resumen de la técnica	Page / Página	16
--------------------------------------------------	---------------	----

Product Number: DNOV002 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Testosterone (17 β -Hydroxy-4-androstene-3-one) is a steroid hormone from the androgen group mainly produced by the Leydig cells located in the testes and, minimally, by the ovaries and the adrenal cortex. It is also present in women who, compared to men, have a greater tendency to convert into estrogen this hormone. .

In postpubertal males, testosterone is secreted primarily by the testes with only a small amount derived from peripheral conversion of androstenedione. In humans is deputy to the development of the sexual organs (differentiation of the testis and the whole genital apparatus) and of secondary sexual characteristics, such as beard, hair distribution, the timbre of the voice and muscles. The testosterone, during puberty, is also involved on skeletal development, limiting the elongation of the long bones and avoiding, in this way, a disproportionate growth of the limbs. In adult humans, the levels of testosterone have a very important role as regards the sexuality, the musculoskeletal system, the vitality and good health (mainly understood as protection from metabolic diseases such as hypertension and diabetes mellitus); helps to ensure fertility, as it stimulates the maturation of sperm in the testes. It also influences the quality and quantity of sperm produced, since the seminal work on the streets and on the prostate, deputies to the production of sperm. Daily production of testosterone in men varies from 5 to 7 milligrams, but exceeded 30 years, tends to decrease annually by 1%.

In adult women over 50% of serum testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione secreted by the adrenal and ovary, with the remainder from direct secretion of testosterone by these glands. The majority of circulating testosterone is bound by SHBG and a smaller portion is bound by albumin. Only a small percentage (<1%) exists in circulation as unbound or free testosterone.

Testosterone effects can be classified as virilizing and anabolic effects, although the distinction is somewhat artificial, as many of the effects can be considered both. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs, and after birth (usually at puberty) a deepening of the voice, growth of the beard and axillary hair (male secondary sex characteristics).

Testosterone levels decline gradually with age in men (andropause). The signs and symptoms are non-specific, and are generally associated with aging such as loss of muscle mass and bone density, decreased physical endurance, decreased memory ability and loss of libido.

In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilizing conditions, including adrenal tumors and polycystic ovarian disease.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of total Testosterone in human serum or plasma.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Testosterone in the blood is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin); the unbound Testosterone (< 1% of total Testosterone) is known as "free Testosterone". The chemical formulation of this assay allows to release completely the Testosterone from bound proteins; thus the NovaTec Testosterone kit allows to measure the concentration of total Testosterone (bound + free) in the sample. For the measurement of free Testosterone only, the NovaTec "Free Testosterone" kit is available.

Microtiter strip wells are precoated with anti-Testosterone antibodies (solid-phase). Testosterone in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Testosterone (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of Testosterone in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-Testosterone IgG Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Testosterone antibody; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Testosterone conjugate:** 1 bottle containing 12 ml of horseradish peroxidase labelled Testosterone.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10x conc.:** 1 bottle containing 50 ml of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0.0015%
- **Testosterone control A:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle.

- **Testosterone control B:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle.
- **Testosterone Standards:** 5 bottles, 1 ml each
 - Standard 0: 0.0 ng/ml
 - Standard 1: 0.2 ng/ml
 - Standard 2: 1.0 ng/ml
 - Standard 3: 4.0 ng/ml
 - Standard 4: 16.0 ng/ml

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm)
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes
- Rotating mixer
- Distilled water
- Timer
-

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C .

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) before starting the test run for at least 30 minutes! At the end of the assay store the reagents immediately at 2-8° C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Testosterone antibodies. Store at 2...8 °C in the dark. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C in the dark,; once opened, the microplate is stable until expiry date of the kit.*

6.2. Testosterone-HRP Conjugate

Ready to use. Mix gently for 5 minutes with a vortex mixer.
After first use the conjugate is still stable for another 6 months if stored at 2...8 °C.

6.3. Testosterone Standards

The standards are ready to use and have the following concentration of Testosterone:

Standard 0:	0.0 ng/ml
Standard 1:	0.2 ng/ml
Standard 2:	1.0 ng/ml
Standard 3:	4.0 ng/ml
Standard 4:	16.0 ng/ml

The solutions have to be stored at 2...8 °C. *After first use the standards are still stable for another 6 months if stored at +2...+8° C.*

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first use the TMB substrate solution is still stable for another 6 months if stored at 2...8 °C.*

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first use stable until expiry date.*

6.6. Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.7. Testosterone Controls

Ready to use. The bottles contain 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma samples with this assay. If the assay on the same day as sample collection, the specimen should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*

Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair Testosterone determination.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for control A
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control B

It is recommended to determine standards, controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 25 µl standards, controls and samples into their respective wells. Add 100 µl conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour at 37°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well 3 times with 300 ml of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
7. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently. *Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*
8. Measure the absorbance (E) of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample in the distribution and identification plan.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (Four Parameter Logistic).

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/ml.

9.2. Reference values

The serum-Testosterone reference values are:

	n° sera	Median pg/ml	Range pg/ml
Male (age)			
< 12	16	< 0,10	< 0.10 - 1.01
12 - 18	16	5,02	0.56 - 8.63
19 - 55	16	3,54	2.12 - 6.01
> 55	16	1,51	0.11 - 7.25
Female (age)			
< 12	16	< 0,10	< 0.10 - 0.16
12 - 18	15	0,23	< 0.10 - 0.63
19 - 55	16	0,20	< 0.10 - 0.63
> 55	16	0,13	< 0.10 - 0.32

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Testosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (16x) of three different sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.0\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (9x) of three different sera in different lots. The between assay variability is $\leq 8.3\%$.

11.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham is:

Testosterone	100%
DHT	2.03%
Androstenedione	0.01%
Androsterone	0.05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0.01%
Cortisone	0%
17 α Estradiol	0.16%
Estrone	0%
Prednisone	0.01%

11.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of testosterone that can be distinguished from the zero standard is 0.10 ng/ml at the 95 % confidence limit.

11.4. Accuracy

The recovery of 0.4 - 0.8 - 4.0 - 14.0 ng/ml of Testosterone added to the sample gave an average value of 98.9% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 4 times gave an average value of 99.7%.

11.5. Correlation with RIA

The new Testosterone ELISA kit was compared to the old Testosterone ELISA kit. Serum samples from 24 females and 28 males were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 1.13 \cdot X + 0.06$$

$$r^2 = 0.92$$

The new Testosterone ELISA kit was compared to another commercially available Testosterone assay. Serum samples of 24 females and 29 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.89 \cdot X + 0.24$$

$$r^2 = 0.93$$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in humans or animals
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.

- When using automatic equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on ELISA automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Testosterone from 0.2 to 16.0 ng/ml
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Microbiologically contaminated samples should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should also not be used.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300[®] as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The NovaTec ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:

DNOV002

Testosterone (96 Determinations)

1. INTRODUCCIÓN

La Testosterona (17β-hidroxi-4-androsteno-3-ona) es una hormona esteroide del grupo de andrógenos producido principalmente por las células de Leydig localizadas en los testículos y, en pequeña parte, por los ovarios y la corteza adrenal. También está presente en las mujeres que, en comparación con los hombres, tienen una mayor tendencia a convertir esta hormona. En los hombres después de la pubertad, la testosterona es secretada principalmente por los testículos, con sólo una pequeña cantidad de derivados de periféricos conversión de androstenediona. En el hombre es disputado al desarrollo de los órganos sexuales (diferenciación testicular y todo el aparato genital) y de las características sexuales secundarias, como la barba, la distribución del vello, el timbre de la voz y los músculos. La testosterona, durante la pubertad, también interviene en el desarrollo esquelético, lo que limita el alargamiento de los huesos largos y evitar, de esta forma, un crecimiento desproporcionado de las extremidades. En los adultos, los niveles de testosterona tienen un papel muy importante en cuanto a la sexualidad, el sistema músculo-esquelético, la vitalidad y buena salud (entendida principalmente como protección contra las enfermedades metabólicas como la hipertensión y la diabetes mellitus); ayuda a asegurar la fertilidad, ya que estimula la maduración de espermatozoides en los testículos. Además, influyen en la calidad y cantidad de espermatozoides producidos, ya que el trabajo fundamental en las células y en la próstata, los disputados a la producción de espermatozoides. La producción diaria de testosterona en los hombres varía de 5 a 7 miligramos, pero superó 30 años, tiende a disminuir anualmente por 1%.

En las mujeres adultas el 50% de la testosterona sérica se deriva de la conversión periférica de androstenediona secretada por las glándulas suprarrenales y los ovarios, y el resto de la secreción directa de la testosterona por estas las glándulas. La mayoría de la testosterona circulante se une a la SHBG y una porción más pequeña se une a la albúmina. Sólo una pequeña parte (< 1%) circula como testosterona libre.

Efectos de la testosterona puede ser clasificado como efectos virilizantes y anabolizantes, Aunque la diferencia es algo artificial, como muchos de sus efectos podría considerarse simultáneamente. Los efectos anabólicos incluyen un crecimiento de la masa y fuerza muscular, aumento de la densidad ósea y la resistencia, y estimulación en el crecimiento lineal y maduración ósea. Los efectos virilizantes incluyen la maduración de los órganos sexuales, y después del nacimiento (normalmente en la pubertad) un engrosamiento de la voz, el crecimiento de la barba y el vello axilar (los caracteres sexuales secundarios masculinos).

Los niveles de testosterona disminuyen gradualmente con la edad en los hombres (andropausia). Los signos y síntomas no son específicos, y están generalmente asociados con el envejecimiento, la pérdida de masa muscular y densidad ósea, disminución de la resistencia física, disminución de la capacidad de memoria y pérdida de la libido.

En las mujeres de todas las edades, niveles elevados de testosterona puede estar asociada con una variedad de condiciones de virilización, incluyendo Los tumores suprarrenales y ovarios poliquísticos.

2. USO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de Testosterona total en suero o plasma humano.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La testosterona en la sangre se une a las SHBG (60%) y, en menor cantidad, a otras proteínas (por ejemplo albúmina). La testosterona no ligada a proteínas de transporte (<1 % del testosterona total) se define como testosterona libre. La formulación química de este kit permite liberar completamente la testosterona unida a proteínas; por lo tanto el kit NovaTec Testosterone permite la medición de la concentración de la Testosterona total (combinado + libre) en la muestra. Si se desea medir la testosterona únicamente la fracción libre, utilícese el kit ELISA NovaTec "Free Testosterone" ("Testosterona Libre").

Los pozos de microtitulación de las tiras se encuentran recubiertos con anticuerpos anti -Testosterona (fase sólida). La Testosterona en la muestra compete por la unión a éstos anticuerpos con Testosterona marcada con peroxidasa de rábano picante (antígeno marcado con enzima). Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de Testosterona presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo de punto final. La absorción a 450 nm se lee con un lector de microplacas de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Pozos recubiertos con IgG anti- Testosterona:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-cuerpos anti-Testosterona y vienen empacados en una bolsa de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial que contiene 15 ml de ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado Testosterona:** 1 vial que contiene 12 ml de Testosterona marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial que contiene 15 ml de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (H₂O₂-TMB 0,26 g/l) (evitar cualquier contacto con la piel).

- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 vial de 50 ml tampón fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015 %.
- **Testosterone control A:** 1 vial que contiene 1ml de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Testosterone control B:** 1 vial que contiene 1ml de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Estándares de Testosterona:** 5 botellas, 1 ml cada una
 - Estándar 0: 0.0 ng/ml
 - Estándar 1: 0.2 ng/ml
 - Estándar 2: 1.0 ng/ml
 - Estándar 3: 4.0 ng/ml
 - Estándar 4: 16.0 ng/ml

4.2. Materiales suministrados

- 1 Soporte para tiras
- 1 Lámina sellante
- 1 Protocolo de procesamiento
- 1 Plan de distribución e identificación

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Incubador a 37°C
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Pipetas
- Mezclador de rotación
- Agua destilada
- Temporizador
-

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y patrones a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente !

6.1. Tiras recubiertas rompibles

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-Testosterona. Se deben conservar a oscuras a una temperatura de entre 2...8 °C. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

6.2. Conjugado Testosterona-HRP

Listo para usar. Mezcle suavemente por 5 minutos con un mezclador vortex.

Después del primer uso del conjugado sigue siendo estable por otros 6 meses si se almacenan a 2 ... 8 ° C

6.3. Estándares de Testosterona

Los estándares están listos para ser usados y tienen las siguientes concentraciones de Testosterona:

Estandar 0:	0.0 ng/ml
Estandar 1:	0.2 ng/ml
Estandar 2:	1.0 ng/ml
Estandar 3:	4.0 ng/ml
Estandar 4:	16.0 ng/ml

La solución debe ser almacenada a 2...8°C. *Después del primer uso del conjugado sigue siendo estable por otros 6 meses si se almacenan a 2 ... 8 ° C*

6.4. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse. Después del primer uso de la solución de sustrato TMB sigue siendo estable por otros 6 meses si se almacenan a 2 ... 8 ° C.*

6.5. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0.15 M (R 36/38, S 26). Esta solución está lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C. *Después del primer uso, permanece estable hasta la fecha de caducidad.*

6.6. Solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.7. Controles de Testosterona

Listo para usar. Las botellas contienen 1 ml de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Use suero o plasma para la determinación de Testosterona. Si la muestra(s) no puede ser analizada el mismo día de la recolección de la muestra, la muestra debe ser almacenada en alícuotas y congelada (-20 °C). Si las muestras se almacenan congeladas mezcle bien cada muestra antes de realizar la prueba. *Evite congelar y descongelar repetidamente.*

El tratamiento del paciente con cortisona, esteroides naturales o sintéticos pueden afectar la determinación de la testosterona.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente el protocolo de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar el ensayo, se debe establecer cuidadosamente la distribución e identificación de las muestras y los estándares en la hoja de resultados suministrada con el kit. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el blanco sustrato
2 pozos (por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, B2+B2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, D2+E2)	para el control A
2 pozos (por ejemplo, F2+G2)	para el control B

Se recomienda determinar los estándares y muestras de pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

Ajuste el incubador a 37°C±1

1. Agregue 25 µl de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos. Agregue 100µl de conjugado a cada pocillo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
2. Cubra los pozos con la hoja incluida en el paquete.
3. **Incube por 1 hora a 37°C**
4. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina sellante, aspire el contenido de los pozos y los pozos 3 veces con 0,3 ml de solución de lavado diluida. Agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavado automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

5. Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
6. **Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
7. Agregue 100 µl de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca.

Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.

- Leer la absorbancia a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a **cero** usando el **substrato blanco en el pozo A1**

Si - por razones técnicas - el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del substrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!.

Mida la absorbancia de todos los pozos a **450 nm** y registre los valores de absorbancia para cada estándar y muestra de paciente indicado en el plan de distribución e identificación.

Cuando sea necesario, calcule el **valor media de la absorbancia** de los duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Cálculo de los resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva estándar y cada muestra. Grafique el valor medio de absorbancia de los estándares versus la concentración. Dibuje la curva que mejor se ajuste a los puntos trazados (Ej.: Logística de cuatro parámetros). Interpole los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en ng/l.

9.2. Valores de referencia

Los valores de testosterona en suero son los siguientes:

	n° sera	Medio pg/ml	Rango pg/ml
Masculino (edad)			
< 12	16	< 0,10	< 0.10 - 1.01
12 - 18	16	5,02	0.56 - 8.63
19 - 55	16	3,54	2.12 - 6.01
> 55	16	1,51	0.11 - 7.25
Femenino (edad)			
< 12	16	< 0,10	< 0.10 - 0.16
12 - 18	15	0,23	< 0.10 - 0.63
19 - 55	16	0,20	< 0.10 - 0.63
> 55	16	0,13	< 0.10 - 0.32

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá probar controles en los niveles normales, altos y bajos niveles de testosterona para supervisar funcionamiento del análisis. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y se debe determinar sus valores cada vez que se realice el ensayo. Se deben llevar gráficas de éstos controles de calidad para hacerle seguimiento al desempeño de los reactivos. Se deben emplear los métodos estadísticos pertinentes para verificar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites aceptables de desempeño para el ensayo. Otros parámetros que se deben controlar son los interceptos al 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad intercorrida. Además, la absorción máxima debe ser consistente con la experiencia del laboratorio. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos. Deben usarse reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

11.1. Precisión

Variación intraensayo

La variación intracorrida fue determinada por mediciones repetidas (16x) de tres sueros diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrida del ensayo es ≤ 7.0 %.

Variación interensayo

La variación intercorrida fue determinada por mediciones repetidas (9x) de tres sueros diferentes con lotes distintos. La variabilidad interensayo es ≤ 8.3 %.

11.2. Especificidad

La reacción cruzada del anticuerpo calcula en el 50% de acuerdo con Abraham es la siguiente:

Testosterona	100%
DHT	2.03%
Androstenediona	0.01%
Androsterona	0.05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0.01%
Cortisona	0%
17 α Estradiol	0.16%
Estrona	0%
Prednisona	0.01%

11.3. Sensibilidad

La concentración detectable más baja de Testosterona que se puede distinguir del estándar 0 es 0.10 ng/ml con un límite de confianza del 95%.

11.4. Exactitud

La recuperación de 0.4, 0.8, 4.0, 14 ng / ml de testosteron añadido a la muestra dio un valor medio de 98,9 % con respecto a las concentraciones original.

La prueba de dilución efectuada en 3 muestras diluidas hasta 4 veces dio un valor medio de 99,7 %.

11.5. Correlación con RIA

El nuevo kit Testosterone ELISA se ha comparado con el kit Testosterone ELISA del método anterior. Se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 28 hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 1.13 \cdot X + 0.06$$

$$r^2 = 0.92$$

El nuevo kit Testosterone ELISA fue comparado con otro kit commercial de Testosterone. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 29 hombres..

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 0.89 \cdot X + 0.24$$

$$r^2 = 0.93.$$

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el Artículo 1, Párrafo 2b de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europea sobre el uso de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro, es responsabilidad del fabricante asegurar la idoneidad, desempeño y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No esta autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.

- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinado para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- El material de origen animal utilizados en la preparación del kit ha sido obtenida de animales certificados como sana y la proteína bovina ha sido obtenida de países no infectados por la EEB, pero estos materiales debe manejarse como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- Si utiliza un equipo automático , es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal, u oxidantes. No congelar la solución.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Este método permite la determinación de testosterona de 0.2 ng/mL hasta 16 ng/mL.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de interrupción está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de azida de sodio (NaN₃) o de Proclin 300[®] como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La azida de sodio puede ser tóxico si se ingiere o absorbe a través de la piel o los ojos ; por otra parte , puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si utiliza un fregadero para eliminar los reactivos, permitirá desplazarse a través de grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida .
- El NovaTec ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

12.1. Consideraciones para El Descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

13. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Prod. No.: DNOV002 Testosterone (96 Determinations)

LITERATURE/ BIBLIOGRAFÍA















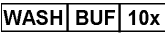

Joshi, U. M. et al.; Steroids 1979, 34 (1), 35

Turkes, A. et al.; J Endocrinol. 1979, 81 (2), P165

Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R.; J. Clin. Endocr. Metab. 1972, 34, 177 – 184

Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 1977

Widsom G. B.; Clin. Chem. 1976, 22/8, 1243 - 1255

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Keep away from direct sun / Vor Sonnenlicht schützen / Protéger de rayonnement solaire / Proteger de la luz solar.
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE / Marca CE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca / Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
	Control/ Kontrolle/ contrôle / controllo / control / controle/ controllo
	Calibrator resp. Standard/ Kalibrator bzw. Standard/ Calibrateur resp Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante / Solução de paragem
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB / Solução substrato TMB
	Washing solution 10x concentrated / Waschlösung 10x konzentriert / Solution de lavage concentré 10 x / soluzione di lavaggio concentrazione x10/ solución de lavado concentrado x10/ Solução de lavagem concentrada 10x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Testosterone

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 4	Controls	Sample
Standard 0 - 4	-	25 µl	-	-
Controls	-	-	25 µl	-
Sample	-	-	-	25 µl
Conjugate	-	100 µl	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution In case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.				
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark				
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.				

NovaTec Immundiagnostica GmbH Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

DNOV002-engl,es-05082015-CS